

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO

EMMANUEL VERÍSSIMO DE ARAÚJO

**EFEITOS DA DISLIPIDEMIA MATERNA SOBRE PARÂMETROS
CARDIOVASCULARES, RESPIRATÓRIOS E METABÓLICOS NA PROLE DE
RATOS**

João Pessoa

2017

EMMANUEL VERÍSSIMO DE ARAÚJO

**EFEITOS DA DISLIPIDEMIA MATERNA SOBRE PARÂMETROS
CARDIOVASCULARES, RESPIRATÓRIOS E METABÓLICOS NA PROLE DE
RATOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Departamento de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como requisito à obtenção do título de Bacharel em Nutrição.

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ LUIZ DE BRITO ALVES

João Pessoa

2017

A447e Almeida, Emmanuel Veríssimo de.

Efeitos da dislipidemia materna sobre parâmetros cardiovasculares, respiratórios e metabólicos na prole de ratos / Emmanuel Veríssimo de Araújo. - - João Pessoa, 2017.

49f.: il. -

Orientador: José Luiz de Brito Alves.

Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

1. Metabolismo lipídico e glicídico. 2. Hipertensão arterial sistêmica. 3. Sistema nervoso autonômico simpático. 4. Quimiossensibilidade. 5. Estresse oxidativo. 6. Nutrição.

BS/CCS/UFPB

CDU: 612.396-7(043.2)

EMMANUEL VERÍSSIMO DE ARAÚJO

**EFEITOS DA DISLIPIDEMIA MATERNA SOBRE PARÂMETROS
CARDIOVASCULARES, RESPIRATÓRIOS E METABÓLICOS NA PROLE DE
RATOS**

Aprovado em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves

Orientador Titular

(UFPB/Centro de Ciências da Saúde/Departamento de Nutrição).

Profa. Dra. Leylliane de Fátima Leal Interaminense de Andrade

Membro Interno - Titular

(UFPB/Centro de Ciências da Saúde/Departamento de Nutrição).

Prof. Dr. Vinícius José Baccin Martins

Membro Externo - Titular

(UFPB/Centro de Ciências da Saúde/Departamento de Fisiologia e Patologia).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, **Maria do Carmo Veríssimo de Souza Araújo**, por sempre me apoiar nas minhas escolhas, por acreditar no meu potencial e por ter cuidado de mim durante todos esses anos. Te amo mãe!

Agradeço ao meu pai, **Adélio Cavalcanti de Araújo**, pelo seu comprometimento com essa família. Sempre serás meu exemplo de pessoa perseverante e forte, que não começa uma coisa sem termina-la com o maior grau de perfeição possível.

Aos meus irmãos **Eduardo, Patrícia, Pollyana** e também a minha cunhada **Ivana** que veem me acompanhando nessa caminhada, e participando direta ou indiretamente no meu progresso acadêmico.

Aos meus sobrinhos **Eduardo e Thais**, que apesar de possuírem suas diferenças, eu tive a sorte de ter algumas afinidades com um e outras com o outro e assim conseguimos alimentar essas semelhanças que nos matem cada vez mais unidos e me permite participar da vida de vocês de forma bastante amigável e prazerosa.

Ao meu amigo de todas as horas **Djhermerson**, uma das pessoas mais humilde e prestativa que já tive o prazer de conhecer, você sempre esteve presente elevando minha autoestima. Obrigado pelo apoio e eu desejo muito sucesso para você guerreiro.

As minhas amigas de escola (sim, sempre será uma escola para mim). **Luana** com todo seu estresse (rsrsrs), ela é o tipo de pessoa que nunca deixa um amigo para trás, bastante preocupada com o nosso bem estar (os sinistros), levarei comigo ótimas lembranças dos nossos momentos únicos. **Rayanne**, uma pessoa de tamanha humildade, simplicidade e sabedoria que em muitas situações mostrou ser a pessoa mais sensata, também levarei ótimas recordações de muitos momentos únicos com você. **Larissa**, essa menina pequenina de coração tão grande, eu sempre admirei sua dedicação (e sua grafia mágica, rsrs), você também esteve bastante presente durante toda a graduação e também fico feliz por estarmos acabando ainda mais unidos. Espero continuar sendo seu companheiro durante a pós graduação. **Karol**, a pessoa que revolucionou minha vida tantas vezes, que esteve presente em tantos momentos que vivi tão intensamente. Não vou me alongar tanto, mas em resumo, digo que você é um porto seguro para mim.

Ao meu amigo **Eduardo Amorim**, onde apesar de não fazer tanto tempo que nos conhecemos, rapidamente nos tornamos parceiros de faculdade, laboratório (tive esse imenso prazer de poder me aventurar nesse mundo mágico contigo mesmo que em um curto período

de tempo) e da vida devido talvez as nossas semelhanças e afinidade. Guardarei ótimas lembranças vividas com você amigo. Um forte abraço!

Também agradeço ao Prof., Mestre, amigo, fisiologista, **Francisco Júnior** ou **Júnior**, que é uma grande expiração para mim, nossa, é muito difícil ver um cara que fala de fisiologia com tanta propriedade quanto você. Saiba que tens um lugar especial no meu córtex cerebral (nada de coração aqui rrsrs).

Ao meu grande mestre e orientador **José Luiz**, talvez eu tenha tido muita sorte da minha graduação coincidir com sua chegada ao docente do curso de nutrição. Foi o casamento perfeito para mim, das disciplinas de base com a nutrição. Poxa, mesmo antes de entrar na faculdade eu já sonhava em fazer grandes descobertas, sempre admirei muitos pesquisadores e você foi a porta de entrada para mim. Sempre serei grato por isso. Sempre!

Um agradecimento enorme também para as pessoas que me criticaram, sem vocês eu não teria feito o que fiz e da forma que fiz. Minha sincera gratidão a todos os professores e colegas do curso!

RESUMO

A dislipidemia materna é uma condição clínica de difícil tratamento e caracterizada pela presença de estresse oxidativo. Neste trabalho, investigamos os efeitos da dislipidemia durante a gestação e lactação sobre parâmetros cardiorrespiratórios e metabólicos na prole de ratos. Os protocolos foram aprovados pelo CEUA/UFPB (nº 014/2016). Ratas prenhes foram divididas em: um grupo que recebeu dieta controle (CTL, n =5) e outro com dieta dislipidêmica (DLP, n=5) durante a gestação e lactação. Parâmetros bioquímicos, tais como: testes oral de tolerância à glicose (TOTG), tolerância à insulina (TTI), glicemia de jejum (GJ), colesterol total (CT), lipoproteínas de alta (HDL), baixa (LDL) e muito baixa (VLDL) densidade e triglicerídeos (TG) foram mensurados ao final da lactação nas mães e dos filhotes aos 90 dias, assim como também foram avaliados os parâmetros cardiorrespiratórios através da medição direta da pressão arterial (PA), frequência cardíaca (FC), e ventilatórios por pletismografia de corpo inteiro. Mensuramos também a frequência respiratória (FR), volume corrente (VT) e ventilação (VE) durante um período basal e após a administração de: mistura hipercápnica (7 % CO₂) para avaliarmos o quimiorreflexo central, de cianeto de potássio (KCN (0,04%)) para avaliação do quimiorreflexo periférico e hexametônio (30 mg/kg) para avaliação da atividade simpática. Durante o registro basal da PA, avaliamos a variabilidade da FC e PA e parâmetros eletrocardiográficos. Por fim, verificamos os níveis de malondialdeído (MDA) sérico. Os resultados estão expressos como média±e.p.m. e o teste t-Student não-pareado foi utilizado para comparação dos grupos. O nível de significância foi fixado em p<0,05. Ao final da lactação, ratas DLP exibiram hiperlipidemia comparado ao grupo CTL. Em adição, ratas DLP apresentaram hiperglicemia no TOTG e TTI. A prole DLP apresentou baixo peso ao nascer (p<0.05) comparado ao grupo CTL. Aos 90 dias, os parâmetros glicídicos e lipídicos foram semelhantes entre as proles CTL ou DLP. Em condições basais, os ratos DLP apresentaram PA média elevada (CTL: 90±5,5 vs DLP:121±2,9 mmHg), mas sem alterações na FC, FR, VT e VE. Na análise espectral, os ratos DLP exibiram aumento no componente LF (CTL: 4,8±0,4 vs DLP: 9±0,9 mmHg²) e na razão LF/HF (CTL: 0,13±0,02 vs DLP: 0,29±0,007), sem alterações no HF. Com relação aos componentes do ECG, os intervalos foram semelhantes entre os grupos. Durante hipercapnia, o grupo DLP exibiu maior resposta no ΔFR (CTL: 43,5±2,8 vs DLP:65,4±4,6 resp/min) e no ΔVE (CTL:710±71 vs DLP: 1061±130 mL/Kg/min), mas sem modificação no ΔVT. Após administração do KCN, os ratos DLP exibiram respostas pressórica (CTL: 58,4±3.9 vs DLP:86±6.3 mmHg) e ventilatória maiores (CTL: 104±9.1 vs DLP:158±14.2 resp/min) e sem alterar a resposta bradicárdica (CTL: 269±17.4 vs DLP: 252±14.9 bpm). Em adição, os ratos DLP apresentaram maior redução da PA (CTL: 27±2 vs DLP: 48±4 mmHg) após o efeito do hexametônio, comparado ao grupo CTL. Esses achados foram combinados com elevados níveis séricos de MDA (p<0.05) na prole de ratos de mães DLP. A prole de ratos machos DLP apresenta hipertensão na vida adulta combinada com hiperatividade simpática e respostas ventilatórias e autonômicas amplificadas frente à hipóxia e hipercapnia.

Palavras-chave: Metabolismo lipídico e glicídico. Hipertensão arterial sistêmica. Sistema nervoso autonômico simpático. Quimiossensibilidade. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Dyslipidemia is a maternal clinical condition difficult to treat and characterized by the presence of oxidative stress. In this work, we investigated the effects of Dyslipidemia during gestation and lactation on cardiorespiratory and metabolic parameters in rat offspring. The protocols have been approved by the CEUA/UFPB (n° 014/2016). Pregnant rats were divided into a control diet Group (CTL, n = 5) and another with dyslipidemic diet (DLP, n = 5) during pregnancy and lactation. Biochemical parameters, such as oral glucose tolerance tests (TOTG), tolerance to insulin (TTI), fasting glucose (GJ), total cholesterol (TC), high lipoprotein (HDL), low (LDL) and very low (VLDL) density and triglycerides (TG). Were measured at the end of lactation in the mothers and babies to 90 days, as well as cardiorespiratory parameters were evaluated by direct measurement of blood pressure (BP), heart rate (HR), and ventilation for full body plethysmography. We measured also the respiratory rate (FR), tidal volume (VT) and ventilation (VE) during a period of basal and after hypercapnic mix (7% CO₂) to evaluate the central chemoreflex of potassium cyanide (KCN (0.04%)) for evaluation of the peripheral chemoreflex and hexamethonium (30 mg/kg) for evaluation of sympathetic activity. During registration the basal PA, evaluated the variability of the FC and PA and electrocardiographic parameters electrocardiographic. Finally, we checked the levels of serum malonaldehyde (MDA). The results are express as mean \pm e.p.m. and non-paired Student's t was use for comparison of groups. The significance level was set at $p < 0.05$. At the end of lactation, DLP rats exhibited Hyperlipidemia compared to CTL group. In addition, DLP rats showed hyperglycemia at TOTG and TTI. The DLP offspring showed low birth weight ($p < 0.05$) compared to CTL group. To 90 days, glycerides and lipid parameters were similar among the descendants CTL or DLP. In basal conditions, the rats showed high average PA DLP (CTL: 90 ± 5.5 vs. DLP: 121 ± 2.9 mmHg), but without changes in CF, FR, VT and see. In spectral analysis, the mice exhibited increased LF component DLP (CTL: 4.8 ± 0.4 vs. DLP: 9 ± 0.9 mmHg²) and LF/HF ratio (0.13 ± 0.02 vs. CTL: DLP: 0.29 ± 0.007), without changes in HF. With respect to the components of ECG, the intervals were similar between the groups. During hypercapnia, the DLP group exhibited greater response in Δ FR (CTL: 43.5 ± 2.8 vs. DLP: 65.4 ± 4.6 resp/min) and Δ VE (CTL: 710 ± 71 vs DLP: 1061 ± 130 mL/Kg/min), but without modification in Δ VT. After administration of KCN, the mice exhibited pressure responses DLP (CTL: 58.4 ± 3.9 vs. DLP: 86 ± 6.3 mm Hg) and ventilation (CTL: 104 ± 9.1 vs DLP: 158 ± 14.2 resp/min) and without changing the answer bradycardic (CTL: 269 ± 17.4 vs DLP: 252 ± 14.9 bpm). In addition, the rats had higher BP reduction DLP (CTL: 27 ± 2 vs. DLP: 48 ± 4 mmHg) after the effect of hexamethonium, compared to CTL group. These findings were combine with high serum levels of MDA ($p < 0.05$) in the offspring of mice of mothers DLP. The offspring of male features DLP hypertension in adult life combined with sympathetic hyperactivity and ventilatory responses and autonomics amplified front of hypoxia and hypercapnia.

Key words: lipid and Glucose Metabolism. Systemic hypertension. Autonomic sympathetic nervous system. Chemosensitivity. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Avaliação da ingestão alimentar (A), peso corporal (B) e ganho total de peso corporal (C) em ratas que receberam uma dieta controle ou dislipidêmica durante a gestação e lactação. Grupos: controle (CTL, n = 5) e grupo dislipidêmico (DLP). Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$ indica diferença estatística usando ANOVA two-way, seguido do teste post hoc de Bonferroni ou do teste t de Student.....23

Figura 2. Avaliação dos níveis séricos de colesterol total, triglicerídeos, LDL, e HDL (A) e dos índices aterogênicos Triglicerídeo/HDL, CT/HDL e VLDL+LDL/HDL (B) ao final da lactação de ratas que receberam uma dieta controle ou dislipidêmica durante a gestação e lactação. Grupos: controle (CTL, n = 5) e Grupo dislipidêmico (DLP). Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$ indica diferença estatística usando o teste t de Student.....24

Figura 3. Teste oral de tolerância à glicose (A) e teste de tolerância à insulina (B) ao final da lactação em ratas que receberam uma dieta controle ou dislipidêmica durante a gestação e lactação Grupos: controle (CTL, n = 5) e Grupo dislipidêmico (DLP). Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$ indica diferença estatística usando o teste t de Student.....24

Figura 4. Avaliação histopatológica hepática em ratas CTL e DLP ao final da lactação.....25

Figura 5. Peso corporal (A), comprimento naso-anal (B) e índice de Lee (C) na prole de ratos machos expostos à dislipidemia materna durante a gestação e lactação. Grupos: controle (CTL, n = 20) e grupo dislipidêmico (DLP, n=20). Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$ indica diferença estatística usando o teste ANOVA tow-way, seguido do teste post hoc de Bonferroni ou o teste t de Student.....26

Figura 6. Teste oral de tolerância à glicose na prole de ratos machos aos 30 dias de vida de mães expostas à dislipidemia materna durante a gestação e lactação. Grupos: controle (CTL, n = 8) e grupo dislipidêmico (DLP, n=8). Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média. *P <0,05 indica diferença estatística usando o teste ANOVA two-way, seguido do teste post hoc de Bonferroni ou o teste t de Student.....27

Figura 7. Avaliação dos níveis séricos de glicose colesterol total (CT), triglicerídeos, VLDL, e HDL na prole de ratos machos aos 30 dias de vida de mães expostas à dislipidemia materna durante a gestação e lactação. Grupos: controle (CTL, n = 8) e grupo dislipidêmico (DLP, n=8). Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média. *P <0,05 indica diferença estatística usando o teste ANOVA tow-way, seguido do teste post hoc de Bonferroni ou o teste t de Student.....28

Figura 8. Teste oral de tolerância à glicose (A) e teste de tolerância à insulina (B) na prole de ratos machos aos 80 dias de vida de mães expostas à dislipidemia materna durante a gestação e lactação. Grupos: controle (CTL, n = 8) e grupo dislipidêmico (DLP, n=8). Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média. *P <0,05 indica diferença estatística usando o teste ANOVA tow-way, seguido do teste post hoc de Bonferroni ou o teste t de Student.....28

Figura 9. Avaliação dos níveis séricos de glicose colesterol total (CT), triglicerídeos, VLDL, e HDL na prole de ratos machos aos 80 dias de vida de mães expostas à dislipidemia materna durante a gestação e lactação. Grupos: controle (CTL, n = 8) e grupo dislipidêmico (DLP, n=8). Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média. *P <0,05 indica diferença estatística usando o teste ANOVA tow-way, seguido do teste post hoc de Bonferroni ou o teste t de Student.....29

Figura 10. Trecho representativo do registro de PAP, PAM e FC de ratos CTL e DLP.....29

Figura 11. Traçados representativos da pressão arterial pulsátil (PAP) e pressão arterial média (MAP) após hexametônio (A) e do delta de PAM na prole de ratos machos aos 90 dias de vida de mães expostas à dislipidemia materna durante a gestação e lactação. Grupos: controle (CTL, n = 8) e grupo dislipidêmico (DLP, n=8). Os dados são apresentados como médias \pm

erro padrão da média. *P <0,05 indica diferença estatística usando o teste ANOVA two-way, seguido do teste post hoc de Bonferroni ou o teste t de Student.....31

Figura 12. Traçado respiratório representativo em condições basais e após exposição à hipercapnia em ratos machos CTL e DLP aos 90 dias de vida.....32

Figura 13. Frequência respiratória (A), volume corrente (B), ventilação minuto (C) em repouso e após hipercapnia (D, E e F). Durante os cinco minutos de hipercapnia, os valores de PAM e FC foram registrados na prole de ratos machos aos 90 dias de vida de mães expostas à dislipidemia materna durante a gestação e lactação. Grupos: controle (CTL, n = 8) e grupo dislipidêmico (DLP, n=8). Os dados são apresentados como médias ± erro padrão da média. *P <0,05 indica diferença estatística usando o teste ANOVA tow-way, seguido do teste post hoc de Bonferroni ou o teste t de Student.....33

Figura 14. Registro representativo da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) durante a ativação do quimiorreflexo periférico (A) e avaliação da variação de PAM (B), FC (C) e FR (D) na prole de ratos machos aos 90 dias de vida de mães expostas à dislipidemia materna durante a gestação e lactação. Grupos: controle (CTL, n = 8) e grupo dislipidêmico (DLP, n=8). Os dados são apresentados como médias ± erro padrão da média. *P <0,05 indica diferença estatística usando o teste ANOVA tow-way, seguido do teste post hoc de Bonferroni ou o teste t de Student.....34

Figura 15. Concentrações séricas de MDA aos 30 dias (A) e 90 dias de vida (B) na prole de ratos machos de mães expostas à dislipidemia materna durante a gestação e lactação. Grupos: controle (CTL, n = 8) e grupo dislipidêmico (DLP, n=8). Os dados são apresentados como médias ± erro padrão da média. *P <0,05 indica diferença estatística usando o teste ANOVA tow-way, seguido do teste post hoc de Bonferroni ou o teste t de Student.....35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição nutricional das dietas controle e dislipidêmicas (em 100 gramas)	18
Tabela 2. Parâmetros basais de pressão cardíaca, análise espectral e eletrocardiograma (ECG) dos grupos CTL (n. 8) e DLP (n. 8)	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASC Área sob a curva

BRS *Spontaneous Baroreflex Sensitivity* (Sensibilidade Barorreflexa Espontânea)

CO₂ Dióxido de Carbono

CRV Coluna Respiratória Ventral

CT Colesterol Total

CTL Controle

DCNT Doença Crônica não Transmissível

DCV Doença Cardiovascular

DLP Dislipidêmico

DMG Diabetes *Mellitus* Gestacional

DMT2 Diabetes *Mellitus* Tipo 2

DNA *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

EROS Espécies Reativas de Oxigênio

ECG Eletrocardiograma

FC Frequência Cardíaca

FR Frequência Respiratória

H & E Hematoxilina-eosina

HAS Hipertensão Arterial Sistêmica

HDL *High-Density Lipoprotein* (Lipoproteína de alta Densidade)

HDL-c *High-Density Lipoprotein Current* (Lipoproteína de alta densidade circulante)

HF *High frequency* (Alta Frequência)

LDL *Low-Density Lipoprotein* (Lipoproteína de baixa densidade)

LDL-c *Low-Density Lipoprotein current* (Lipoproteína de baixa densidade circulante)

LF *Low Frequency* (Baixa Frequência)

LF/HF *Low Frequency/High Frequency* (Razão Baixa Frequência e Alta Frequência ou simpátovagal)

MDA Malonaldeído

N₂ Nitrogênio (molécula)

NA Núcleo Ambíguo

NaCl Cloreto de Sódio

NTS Núcleo do Trato Solitário

O₂ Oxigênio (molécula)

PA Pressão Arterial

PAD Pressão Arterial Diastólica

PAM Pressão Arterial Média

PAP Pressão Arterial Pulsátil

PAS Pressão Arterial Sistólica

RNA_m *Messenger Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico Mensageiro)

ROS *Reactive oxygen species* (Espécies Reativas de Oxigênio)

RVLM Grupo Rostral Ventrolateral da Medula

SNC Sistema Nervoso Central

SNCA Sistema Nervoso Central Autônomo

TG Triglicerídeos

TOTG Teste Oral de Tolerância à Glicose

TTI Teste de Tolerância à Insulina

VC Volume Corrente

VE Volume Minuto

VLDL *Very Low Density Lipoprotein* (Lipoproteína de muito baixa densidade)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	08
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	10
2.1 FUNÇÕES BIOLÓGICAS DOS LIPÍDIOS E LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS...	10
2.2 DISLIPIDEMIAS, ALIMENTOS PROCESSADOS E SEU IMPACTO PARA A SAÚDE.....	11
2.3 GESTAÇÃO E DISLIPIDEMIA MATERNA.....	12
2.4 EFEITOS DE INSULTOS NUTRICIONAIS MATERNOS SOBRE A PROLE.....	13
2.5 CONTROLE NEURAL DO SISTEMA CARDIO-RESPIRATÓRIO E HIPERTENSÃO ARTERIAL.....	14
3. METODOLOGIA.....	17
3.1 Animais e desenho experimental.....	17
3.2 Efeitos da dieta dislipidêmica durante gestação e lactação sobre o consumo alimentar, ganho de peso e perfil bioquímico materno.....	18
3.3 Avaliação de características somáticas da prole.....	19
3.4 Testes de tolerância a glicose e insulina na prole.....	20
3.5 Parâmetros bioquímicos e de estresse oxidativo dos descendentes.....	20
3.6 Procedimento cirúrgico para registro direto de PA em ratos machos aos 90 dias de idade.....	20
3.7 Medições e análises da pressão arterial e avaliação cardiorrespiratória.....	21
3.8 Análise do Eletrocardiograma.....	22
3.9 Análise espectral.....	22
3.10 Análise estatística.....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5. CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS.....	36

1 INTRODUÇÃO

A dislipidemia é uma condição clínica caracterizada por alterações no metabolismo lipídico, como elevação dos níveis plasmáticos de colesterol total (CT), triglicerídeos (TG) e LDL-c associada com uma diminuição dos níveis de HDL-c, com valores considerados abaixo dos níveis de normalidade (ANVISA, 2011; FALUDI et al., 2017). A apresentação da dislipidemia compreende quatro categorias bem definidas como, hipertrigliceridemia isolada (valores aumentados de TG), hipercolesterolemia isolada (valores aumentados de CT), hiperlipidemia mista (ambos CT e TG elevados) e diminuição isolada do HDL-c ou em associação com aumento de LDL e/ou TG que podem variar de acordo com o perfil bioquímico individual (FALUDI et al., 2017). Tais alterações no perfil lipídico estão fortemente associadas com risco aumentado para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV) e metabólicas (ECKARDSTEIN; SIBLER, 2011; CATAPANO et al., 2016).

O consumo de alimentos industrializados está associado com um aumento de triglicerídeos, em decorrência das quantidades excessivas de sal, gordura, açúcar e do elevado aporte calórico contido nesses alimentos (KANG et al., 2016). Em um estudo brasileiro de coorte realizado com mais de quatro mil jovens, foi constatado que mais da metade dos alimentos ingeridos diariamente por esse grupo eram ultra-processados, ressaltando que jovens do gênero feminino tiveram maior prevalência do consumo desse tipo de alimento (BIELEMANN et al., 2015).

O período gestacional é naturalmente acompanhado por diversas mudanças fisiológicas e hormonais, no qual ocorre um aumento considerado benéfico nas concentrações plasmáticas de lipídios (CT, LDL, HDL e TG) e glicose, garantindo o aporte necessário de nutrientes para o devido desenvolvimento embrionário e fetal. No entanto, a presença excessiva e contínua de alimentos industrializados na dieta materna, pode ocasionar um efeito amplificador dos níveis de TG séricos, configurando um potencial estado de risco patológico materno-fetal (JIANG et al., 2017).

Neste sentido, a dislipidemia materna constitui um sério problema clínico, visto que abordagens seguras e eficientes que auxiliem na melhora do perfil lipídico materno são limitadas quanto ao consumo de dieta saudável e a prática de atividade física e, no entanto, alguns pacientes não respondem positivamente a essas mudanças de estilo de vida.

Eventos adversos experimentados no útero ou durante o início da vida (gestação, lactação e primeira infância) podem afetar o desenvolvimento de sistemas fisiológicos e

aumentar a predisposição de hipertensão arterial sistêmica (HAS) e doenças metabólicas na vida adulta (JIANG et al., 2017; COSTA-SILVA; ALVES-SIMÕES; FERNANDES, 2016). Por exemplo, estudos prévios têm demonstrado que a obesidade durante a gestação e/ou lactação é um importante fator de risco para o desenvolvimento de obesidade, diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) e hipertensão arterial na prole (BUETTNER; SCHOLMERICH; BOLLHEIMER, 2007; VIDAL-SANTOS et al., 2017). Apesar destas consistentes evidências, ainda não foi esclarecido se a dislipidemia materna é um fator de risco para o desenvolvimento de hipertensão arterial e distúrbios metabólicos na prole e quais os possíveis mecanismos estariam envolvidos.

Um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de DCV é a hipertensão arterial sistêmica (HAS), presente em um terço da população adulta mundial em 2010, e a prevalência continua a crescer. A HAS caracteriza-se basicamente pela manutenção dos níveis pressóricos arteriais elevados ≥ 140 mm Hg e ≥ 90 mm Hg das pressões sistólicas e diastólicas, respectivamente (MILLS et al., 2016). A HAS primária ou essencial é o tipo mais comum entre os hipertensos, sua origem é multifatorial, sendo de fácil diagnóstico, porém de causalidade pouco compreendida ou de grande complexidade (JELLINGER et al., 2017).

Um número crescente de evidências demonstrou que alterações metabólicas durante a gestação e/ou lactação podem comprometer o funcionamento da placenta, com consequentes efeitos adversos para o feto, tais como, parto prematuro, mortalidade fetal, anomalias congênitas e macrossomia (ROBERTS et al., 2009; MYATT; MALOYAN, 2016).

Em parte, esses efeitos podem estar associados a um estado exacerbado de estresse oxidativo em comparação com uma gravidez normal (ROBERTS et al., 2009; ROBERTS et al., 2011). Como por exemplo, foi revelada a presença de níveis elevados de radicais livres no plasma e na placenta de gestantes obesas e dislipidêmicas (ROBERTS et al., 2009; ROBERTS et al., 2011).

Estudos prévios têm demonstrado que um desequilíbrio oxidativo entre os fatores pró-oxidantes e enzimas antioxidantes, pode ser um fator contribuidor potencial para o desenvolvimento de hipertensão arterial e desordens metabólicas (CHAN; CHAN, 2012; DE BRITO ALVES et al., 2016). Mecanicamente tem sido descrito que elevados níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) podem contribuir para diminuição da sensibilidade do barorreflexo (SINSKI et al., 2009), maior quimiosensibilidade respiratória (DEL RIO et al., 2012) e hiperatividade simpática (CHAN; CHAN, 2012).

A hiperativação simpática é caracterizada por um aumento na intensidade e na frequência das despolarizações elétricas do nervo simpático e também por um aumento nos

níveis plasmáticos de catecolaminas promovendo constrição dos vasos sanguíneos periféricos, aumento na resistência vascular periférica e consequentemente aumento nos níveis basais da pressão arterial (MALPAS, 1998).

A pressão arterial pode ser modulada indiretamente através da atividade respiratória e a recíproca é evidente, pois ambos possuem grande interação por meio de uma rede neural localizada no sistema nervoso central (SNC), responsável por receber estímulos, processá-los e gerar uma resposta adequada (motora somática ou autonômica). Os estímulos podem ser químicos (captados pelos quimiorreceptores centrais ou periféricos) ou mecânicos (barorreceptor) (MACHADO; ZOCCAL; MORAES, 2017).

Estudos prévios sobre os efeitos de insultos nutricionais maternos induzidos em ratos durante sua gestação e lactação, mostram que os efeitos causados pela dieta materna são capazes de provocar um aumento da sensibilidade quimiorreflexa, hiperatividade autonômica simpática e redução no controle barorreflexo, ressaltando que essas mudanças estariam envolvidas na gênese da hipertensão arterial (BARROS et al., 2015; DE BRITO ALVES et al., 2015; VIDAL-SANTOS et al., 2017).

Apesar destes resultados, ainda não foi demonstrado se a dislipidemia materna poderia alterar a quimiossensibilidade ventilatória, a função barorreflexo e contribuir para hiperatividade simpática e desenvolvimento de hipertensão arterial na prole de ratos. Assim, diante das evidências apresentadas, o presente estudo testou a hipótese de que ratos provenientes de mães dislipidêmicas durante a gestação e lactação desenvolvem hipertensão decorrente de hiperatividade simpática e respiratória e maior sensibilidade de quimiorreceptores ventilatórios.

Desta forma objetivou-se investigar os efeitos da dislipidemia durante a gestação e lactação sobre os níveis de pressão arterial, mecanismos de controle cardiorrespiratórios e parâmetros metabólicos na prole de machos.

Assim como alguns objetivos específicos também foram planejados: Avaliar em ratas submetidas ao ambiente dislipidêmico: o ganho de peso e consumo alimentar durante a gestação e lactação e, o perfil bioquímico ao final da gestação. Como também na prole de ratos jovens (30 dias) e adultos (90 dias) provenientes de mães submetidas ao ambiente dislipidêmico durante gestação e lactação: estudar o padrão respiratório em condições basais; avaliar a resposta dos quimiorreceptores respiratórios após a exposição à hipercapnia (mistura gasosa com 7 % de CO₂); a pressão arterial em não anestesiados; avaliar indiretamente e farmacologicamente a função autonômica simpática; investigar a sensibilidade dos quimiorreceptores periféricos; avaliar o perfil bioquímico.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 FUNÇÕES BIOLÓGICAS DOS LIPÍDIOS E LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Os lipídios biológicos constituem um grupo de substâncias insolúveis em água, encontrados em diversos estados físico (óleos, gorduras e ceras por exemplo) na natureza, e devido a suas propriedades bioquímicas participam de inúmeras funções metabólicas no organismo humano tais como, transporte de substâncias, precursores de hormônios e estruturas celulares, fornecendo energia para a execução de processos metabólicos, armazenamento de substâncias dentre outras (GUYTON; HALL, 2012).

O metabolismo de alguns lipídios plasmáticos tem sido alvo de inúmeros estudos, com destaque para as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) que são encarregadas do transporte de colesterol hepático para os órgãos periféricos, e as lipoproteínas de alta densidade (HDL) que fazem o transporte reverso, pelo qual o colesterol é metabolizado no fígado (FALUDI et al., 2017).

O colesterol, por sua vez, é precursor de hormônios como o cortisol, testosterona, progesterona, vitamina D e outros, além de conferir propriedades físico-químicas cruciais para o adequado funcionamento das membranas celulares. De fato, o papel do colesterol para os processos vitais do organismo é tão importante que a maior parte deste é sintetizado pelo próprio indivíduo. Enquanto que o triglicerídeo, é um lipídio com grande potencial energético em sua estrutura química, podendo ser armazenado no interior dos adipócitos, garantindo uma reserva energética considerável para uso futuro (GUYTON; HALL, 2012).

Como já mencionado, os lipídios séricos são essenciais para a realização de alguns processos fisiológicos, no entanto, quantidades demasiadas desses estão associadas com o surgimento de eventos inflamatórios, como estresse oxidativo, doença aterosclerótica e cardiovasculares, todos deletérios a saúde, e essas alterações do perfil lipídico também caracterizam as dislipidemias (FALUDI et al., 2017).

2.2 DISLIPIDEMIA, ALIMENTOS PROCESSADOS E SEU IMPACTO PARA A SAÚDE

A etiologia da dislipidemia envolve duas causas principais: as primárias, que são aquelas em que o distúrbio lipídico é determinado por fatores genéticos, e as secundárias que podem ser decorrentes do estilo de vida, como por exemplo, a ingestão habitual de uma dieta

desequilibrada (FALUDI et al., 2017). Uma revisão sistemática sul coreana demonstrou que o consumo excessivo de sódio dietético pelos coreanos confirma uma relação direta com o aumento da concentração de triglicerídeos plasmáticos e níveis mais baixos de HDL-c, sendo este último atribuído ao consumo elevado de bebidas açucaradas (KANG et al., 2016).

Em outro estudo de revisão, constatou-se que a ingestão de alimentos tipo *fast foods* por indivíduos jovens estava associado com uma maior propensão para o desenvolvimento de dislipidemias. Ainda foi demonstrado que após uma refeição com *fast foods*, indivíduos apresentaram maiores concentrações de lipemia pós-prandial e de peroxidação lipídica quando comparados a indivíduos que tinham ingerido uma refeição saudável/equilibrada (BAHADORAM; MIRMIRAN; AZIZI, 2015).

Outros estudos demonstram ainda uma relação entre o consumo de alimentos ultraprocessados e hipercolesterolemia em crianças brasileiras (ROUBER et al., 2015) e a prevalência de sobrepeso e obesidade em universitários espanhóis (MENDONÇA et al., 2016), que é um fator de risco relevante para o desenvolvimento de dislipidemias (FALUDI et al., 2017). A partir desses recentes estudos, é possível constatar como o consumo de alimentos com altos teores de açúcares, gorduras saturadas e densamente calóricos, podem ter impacto direto no desenvolvimento de dislipidemias e doenças associadas.

2.3 GESTAÇÃO E DISLIPIDEMIA MATERNA

A gestação humana tem início com a fecundação do óvulo pelo espermatozoide e posterior implantação da parede uterina (GUYTON; HALL, 2012). O período gestacional é marcado por várias mudanças metabólicas, fisiológicas e comportamentais materna. Durante a gravidez, a mãe demonstra aumento do apetite (hiperfagia), além de aumento dos estoques de gordura (lipogênese) seguido de dislipidemia e hiperglicemia, contribuindo em conjunto para tornar o plasma sanguíneo mais nutritivo, favorecendo o suporte nutricional ao feto através da barreira placentária (HERRERA, 2002).

Essas alterações maternas são determinadas pelo aumento da secreção de catecolaminas, de insulina circulante (hiperinsulinemia), da expressão de RNAm da lipase lipoproteica, pela liberação de uma variedade de hormônios, como o estrógeno e ainda pelo comportamento hiperfágico materno. Esse estado de maior anabolismo (reações bioquímicas de formação) no tecido adiposo é mantido no início da gestação porém um estado catabólico (reações bioquímicas de quebra) é sobreposto ao final da gestação coincidindo com o período

de maior crescimento fetal. Esse estado dislipidêmico e hiperglicêmico gestacional é importante para garantir o desenvolvimento fetal (HERRERA, 2002).

A dislipidemia gestacional, ocasionada por níveis muito elevados de lipídios plasmáticos, pode aumentar em até quatro vezes mais do que os níveis detectados no estado pré-gravídico em mulheres. São concentrações lipídicas séricas consideradas acima dos valores saudáveis estabelecidos para a gestação, e além do tratamento limitado, devido ao uso restrito de fármacos hipolipemiantes, com relatos de teratogenicidade, as poucas opções de tratamento, como o aconselhamento dietético e a prática de atividade física, ainda não tem demonstrado efeitos consistentes nem uma forte adesão (FALUDI et al., 2017).

Uma meta análise publicada recentemente mostrou que elevados níveis de LDL, colesterol total, triglicerídeos e menor concentração de HDL têm uma associação direta com maior risco de prematuridade (menos que 37 semanas de gestação), sabendo-se que o parto prematuro é a segunda maior causa de morte em crianças menores de 5 anos de idade (JIANG et al., 2017). Em outro estudo foi possível verificar resultados semelhantes, no qual ratas gestantes que consumiram dieta hipercolesterolêmica durante a gestação apresentaram quatro vezes mais incidência de abortos, aumento de mortalidade neonatal e menor tamanho dos filhotes ao nascimento em comparação a um grupo que consumiu dieta padrão de laboratório (DE ASSIS; SEGURO; HELOU, 2003).

Outras complicações decorrentes da dislipidemia materna são descritas como, diabetes mellitus gestacional (DMG) (FALUDI et al., 2017), microsomia fetal (JIANG et al., 2017) e início do processo aterosclerótico que pode surgir na fase adulta (DO NASCIMENTO et al., 2016). Além disso, também foi relatada uma correlação entre dislipidemia gestacional e estresse oxidativo (SEE-LING; SIRAJUDEEN; HAMID, 2013), podendo representar uma potencial ameaça à saúde materno-fetal.

2.4 EFEITOS DE INSULTOS NUTRICIONAIS MATERNOS SOBRE A PROLE

Alguns achados têm revelado que o estilo de vida materno inadequado pode influenciar em alterações metabólicas e fisiológicas nos descendentes, tornando-os mais propensos ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) como hipertensão arterial sistêmica (HAS) e obesidade (COSTA-SILVA; ALVES-SIMÕES; FERNANDES, 2016).

O período que compreende o desenvolvimento fetal e início da infância (perinatal) é dito como crítico, onde a interação entre fatores ambientais adversos e a conformação fetal

pode resultar no desencadeamento de mecanismos adaptativos que garantem melhores chances de sobrevivência a curto prazo, porém a longo prazo, podem desencadear distúrbios e mudanças fisiológicas que impactam diretamente na saúde (ZOCCAL et al., 2008; DE BRITO ALVES et al., 2014).

Recentemente, foi demonstrado que a prole de ratas que consumiram dieta hiperlipídica durante a gestação apresentou distúrbios no metabolismo glicídico, lipídico e hipertensão arterial aos 60 dias de idade (VIDAL-SANTOS et al., 2017). Outros estudos também demonstraram os efeitos de insultos nutricionais maternos, como a hipercolesterolemia materna (DE ASSIS; SEGURO; HELOU, 2003) e a desnutrição proteica materna (DE BRITO ALVES et al., 2014), ambos resultando no desenvolvimento de doenças metabólicas ou DCNT na prole.

Tem sido demonstrado que micronutrientes também participam de mudanças fenotípicas na prole. Como observado quando ratas no período periconcepcional consumiram dietas restritas em vitaminas do complexo B (destaque para o folato) e metionina, suas proles de ratos machos desenvolveram resistência à insulina e maior pressão sanguínea. Já quando a vitamina B12 e folato foram restritos durante a gestação e lactação, resultaram em filhotes com baixo peso ao nascer, esteatose hepática e hipertrofia do miocárdio. Também foi realizado um experimento onde ratas foram expostas a álcool durante o período pré-natal, sendo constatado resistência à insulina em seus descendentes (LEE, 2015). Esses dados ressaltam a importância da nutrição durante o período perinatal.

2.5 CONTROLE NEURAL DO SISTEMA CARDIO-RESPIRATÓRIO E HIPERTENSÃO ARTERIAL

O coração é um órgão muscular, dividido basicamente em quatro câmaras, um átrio e um ventrículo do lado direito, e igualmente visto no lado esquerdo. O lado direito bombeia sangue para a circulação pulmonar, já as câmaras do lado esquerdo fazem o sangue percorrer a circulação sistêmica ou grande circulação. As câmaras contraem (sístole) e relaxam (diástole) de forma rítmica e alternada, em concordância para a realização eficaz do impulsionamento do sangue (GUYTON; HALL, 2012).

Apesar dos batimentos do coração ser independentes do organismo, ele é regulado pelo sistema nervoso central autônomo (SNCA), que é dividido em simpático ou parassimpático. Como exemplo, pode-se dizer que, diante de uma ameaça iminente há aumento de frequência e de força cardíaca que é causada pela ação do componente simpático,

ou o contrário pode acontecer quando se acaba de realizar uma refeição e o parassimpático age facilitando os processos digestórios e diminuindo a frequência cardíaca (FC) (GUYTON; HALL, 2012).

Além do coração, o sistema circulatório também é composto por vasos sanguíneos, classificados em arteriais, que são responsáveis pelo transporte e suprimento de oxigênio para os diversos órgãos e tecidos, e venosos cuja função de destaque é de ajudar na eliminação de metabólitos resultantes de reações bioquímicas celulares, e que em conjunto funcionam como verdadeiras vias de transporte sanguíneo, nutrientes, células e vários outros compostos por todo o organismo. O sistema circulatório (arterial) é extremamente dinâmico e versátil, no qual o sangue quando percorre os vasos encontra naturalmente uma resistência imposta pelo próprio atrito e a pressão oposta pelas paredes dos vasos, por isso o coração precisa contrair aumentando a pressão a ponto de superar a resistência, para que assim o sangue possa fluir normalmente (GUYTON; HALL, 2012).

Além disso, outras variáveis estão envolvidas diretamente na pressão arterial, sendo basicamente a resistência vascular representada principalmente pelo diâmetro das artérias (que pode se contrair ou relaxar), viscosidade e volume sanguíneo e a frequência e força cardíaca (GUYTON; HALL, 2012).

O sistema respiratório é composto basicamente por vias aéreas (fossas nasais, faringe, laringe, e traquéia), pulmões (direito e esquerdo) e músculos respiratórios. O principal músculo é o diafragma, responsável pela inspiração, que ao se contrair, diminui a pressão intrapulmonar e assim o ar externo adentra-o. Durante a expiração ocorre o contrário, o diafragma relaxa, aumentando a pressão intrapulmonar em relação ao meio exterior fazendo com que o ar seja expulso ou exalado. Essa mobilização de ar garante maior oxigenação para o corpo durante a inspiração e menor quantidade de dióxido de carbono (CO_2) no organismo (GUYTON; HALL, 2012).

O sistema cardiovascular, SNCA e respiratório estão acoplados de tal forma que é possível alterar a pressão arterial através da respiração, assim como a recíproca também é verdadeira. A regulação do sistema integrado cardiorrespiratório pode-se dizer didaticamente que é iniciado pelos barorreceptores e quimiorreceptores. Os barorreceptores são grupamentos celulares especializados em detectar variação de pressão mecânica ou estiramento do vaso, já os quimiorreceptores são formados por células capazes de detectar variações dos níveis de O_2 e CO_2 . Esses receptores estão localizados principalmente no arco aórtico (barorreceptores e quimiorreceptores periféricos, sensíveis principalmente aos níveis de O_2), próximo a bifurcação carotídea (barorreceptores e quimiorreceptores periféricos) e no tronco encefálico

(quimiorreceptor central, detectam principalmente níveis de CO₂) (GUYTON; HALL, 2012; MACHADO; ZOCCAL; MORAES, 2017).

Esses receptores comunicam com o núcleo do trato solitário (NTS) localizado na região dorsal do bulbo, através de sinapses dos nervos vago e glossofaríngeo. Além do NTS, há outros grupamentos de neurônios em nível do tronco encefálico importantes para a regulação desse sistema, como o RVLM (grupo rostral ventrolateral da medula) o principal grupo gerador de atividade simpática, assim como o núcleo ambíguo (NA) responsável por gerar atividade parassimpática e a coluna respiratória ventral (CRV), onde inicia-se a atividade respiratória (ZOCCAL et al., 2014).

Depois que o NTS integra a mensagem vinda dos receptores, os neurônios e grupamentos neuronais pontinos e bulbares, como por exemplo o RVLM, CRV e NA, irão processar e gerar uma resposta que pode ser executada pelo coração, vasos sanguíneos ou músculos respiratórios (efetores). Por exemplo, na condição de hipóxia o quimiorreceptor periférico é ativado enviando uma mensagem para o NTS que por sua vez ativa o NA, o RVLM e o CRV gerando como resposta final uma bradicardia, um aumento da pressão arterial (devido ao aumento da resistência vascular causada por vaso constrição) e taquipnéia (MACHADO; ZOCCAL; MORAES, 2017).

Modelos de hipertensão arterial neurogênica foram demonstrados nos últimos anos. Alguns são atribuídos ao aumento de quimiossensibilidade (DE BRITO ALVES et al., 2014; MACHADO; ZOCCAL; MORAES, 2017) e disfunção do barorreflexo (MEGURO et al., 1989), e essas alterações poderiam estar levando a um aumento de atividade simpática, podendo resultar em um estado de pressão aumentada ou hipertensão arterial. Ressalta-se ainda, que fatores ambientais adversos, como dieta materna desequilibrada ou baixos níveis de oxigênio impostos a animais muito jovens parecem alterar o padrão respiratório e cardíaco e se perpetuam até a vida adulta.

3 METODOLOGIA

Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o guia revisado para o cuidado e uso de animais de laboratório (BAYNE, 1996). O protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo comitê institucional de cuidados e uso de animais (protocolo CEUA-UFPB 014/2016), Universidade Federal da Paraíba, Brasil.

3.1 Animais e desenho experimental

Dez ratas *Wistar* fêmeas virgens (*Rattus norvegicus*) foram mantidas em uma sala com condições ambientais controladas (22 ± 1 ° C; das 18:00 - 6:00 h no ciclo escuro, e restante do dia em ciclo claro (12/12 h)). Foi ofertado dieta padrão de laboratório (52% de carboidratos, 21% de proteína e 4% de lipídios - Purina Agriband, São Paulo, Brasil) e água filtrada *ad libitum*. Aos 90 dias de idade, foi iniciado o período de uma semana para adaptação dietética aos roedores: dieta controle (grupo CTL, n = 5) e dislipidêmica (grupo DLP, n = 5), com dieta ofertada livremente para ambos os grupos. Então, as ratas foram acasaladas em uma gaiola durante algumas noites (uma fêmea para um macho) subsequentes. Após a confirmação da gravidez (por esfregaço vaginal), foram transferidas para gaiolas individuais.

A dieta controle foi produzida de acordo com o Instituto Americano de Nutrição (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993; DE BRITO ALVES et al., 2015) e a dieta dislipidêmica foi adquirida da empresa Rhoster® (Araçoiaba da Serra, São Paulo, Brasil). As dietas (Tabela 1) foram consumidas a partir de adaptação até o final da lactação.

Vinte e quatro horas após o nascimento, a prole foi distribuída aleatoriamente, com proporção de oito filhotes (4 machos e 4 fêmeas) por lactante, para garantir leite suficiente até o desmame. Ao desmamar (dia 22 pós-natal), a prole fêmea e macho foram alojadas separadamente (quatro por gaiola) com acesso livre a água e dieta comercial (padrão) durante todo o experimento. Os grupos experimentais CTL e DLP foram formados com dois ratos de cada ninhada.

Primeiro examinou-se o impacto da dislipidemia materna sobre os parâmetros de lipídios plasmáticos e do metabolismo glicídico em ratos com 30 dias de vida. Em seguida, os ratos machos foram mantidos com água e ração padrão de laboratório *ad libitum* até a idade adulta, onde foram avaliados os parâmetros bioquímicos (aos 80 dias) e cardiorrespiratórios. Os descendentes do sexo feminino não foram incluídos no presente estudo.

Tabela 1. Composição nutricional dietética (g/100g)

Nutrientes	Dieta Controle	Dieta Dislipidêmica
Caseína (85 %)*	20	19.86
Amido dextrinizado	13	15.5
Celulose	5	5
Sacarose	10	6
Amido de milho	39.7	33.6
Óleo de soja	7	3
Banha de porco	0	6
Gordura vegetal		
hidrogenada	0	5
Ácido gálico (Sigma)	0	0.5
Colesterol (Sigma)	0	0.5
Colina	0.25	0.25
Metionina	0.3	0.3
Mix de vitaminas	1	1
Mix de minerais	3.5	3.5
T-BHQ	0.014	0.014

*A caseína possui 85% de pureza (sendo 85 g de caseína realmente, em cada 100 g)

3.2 Efeitos da dieta dislipidêmica durante gestação e lactação sobre o consumo alimentar, ganho de peso e perfil bioquímico materno

Do primeiro ao último dia de gestação, foi acompanhado o consumo e o ganho de peso corporal das ratas, ambos foram pesados em balança digital (modelo AS-1000; Marte), contando com precisão de 0,1 gramas. O consumo de ração foi verificado a partir da diferença entre o montante ofertado e a sobra do dia seguinte (24 horas). O consumo e peso corporal diário foram compilados e expressos para o período de uma semana. Vinte e quatro horas após o desmame, as ratas foram mantidas em jejum por 12 horas (durante a noite), no dia seguinte foi então realizado o teste oral de tolerância à glicose (TOTG). Após 24 horas de recuperação, as ratas passaram por mais um jejum de 12 horas, e na manhã do dia seguinte foi realizado o teste de tolerância à insulina (TTI). Por fim, 48 horas após o TTI as ratas foram mais uma vez submetidas a um jejum de 12 horas, sendo eutanasiadas por decapitação.

O TOTG consiste primeiramente em realizar um corte transversal na extremidade distal da cauda do animal, quase que imediatamente é escoada uma pequena quantidade de sangue, usada para se fazer a primeira aferição glicídica. Em seguida foi administrado solução glicosada (2 g / kg) via gavagem e posteriormente foram feitas aferições em séries, aos 15, 30, 60 e 90 min, utilizando-se o mesmo acesso sanguíneo.

Para o TTI foi realizada administração intraperitoneal de insulina (0,75 UI / kg de peso corporal), e em seguida, os níveis de glicose foram mensurados nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos. Todas as medidas de concentração de glicose plasmática foram realizadas com um glicosímetro Accu-Check (Bayer).

As ratas permaneceram em dieta até o dia da eutanásia, onde foi coletada amostras sanguíneas (soro) para a quantificação de colesterol total (CT), triglicerídeos e HDL com kits comerciais (Bioclin, Belo Horizonte, Brasil). As concentrações de LDL e VLDL foram calculadas pelo uso de fórmulas descritas anteriormente (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972; TRAILL, 1973). Amostras de tecido hepático das ratas também foram coletadas, lavadas em solução salina (NaCl, 0,9%) e fixadas em formalina tamponada (10%) durante 48 horas. Então, as amostras foram fatiadas (espessura de 8 μ m) em microtomo. Dez fatias de cada fígado foram coradas com *Oil Red O* (Sigma, EUA) durante 10 minutos. Em seguida foram examinadas em microscópio de luz (4x e 20x) e foram fotografadas imagens representativas de cada grupo (MEHLEM et al., 2013). Outras dez fatias foram obtidas de cada fígado, coradas com hematoxilina-eosina (H & E) e analisadas sob microscópio de luz comum (Motic BA 200, Kowloon, Hong Kong).

3.3 Avaliação de características somáticas da prole.

O peso corporal foi medido 24 horas após o nascimento, e também nos dias 21°, 30°, 60° e 90° após o nascimento, em balança digital (model AS-1000; Marte). O comprimento do corpo foi medido com uma fita métrica, a distância entre o “nariz e o ânus” (naso-anal). Os dados de peso e comprimento foram usados para determinar o índice de Lee (dividindo-se a raiz cúbica do peso corporal (g) pelo comprimento naso-anal (cm) e multiplicando-se o resultado por 1000) (DE BRITO ALVES et al., 2014).

3.4 Testes de tolerância a glicose e insulina na prole

Aos 30 e aos 80 dias de idade, os ratos foram submetidos a um jejum de 8 horas (noturno) para a realização dos TOTG e TTI, conforme previamente descrito.

3.5 Parâmetros bioquímicos e de estresse oxidativo dos descendentes

Foram realizados com amostras de soro de animais com 30 e 80 dias de nascido. Para isso os descendentes de ambos os grupos passaram por jejum (de 8 ou 12 horas, a depender da idade), em seguida foram anestesiados com cetamina (80 mg / kg) e xilazina (10 mg / kg) e amostras de sangue (aproximadamente 2 mL) foram coletadas pelo rompimento do plexo retro-orbital. As mostras foram então centrifugadas a 300 g, 25 ° C, durante 15 minutos e o soro obtido foi congelado e armazenado (DE BRITO ALVES et al., 2014). Este experimento foi realizado 48 horas após os testes de tolerância à glicose e insulina. As amostras de soro foram usadas para quantificação de CT, HDL, VLDL, LDL, triglicerídeos e glicose com kits comerciais (Bioclin, Belo Horizonte, Brasil).

A concentração de malonaldeído (MDA), um produto final da peroxidação lipídica é usado como indicador de estresse oxidativo. Neste ensaio, o MDA reage com o ácido tiobarbitúrico para produzir um complexo vermelho-colorido. Resumidamente, foram adicionados 400 µL de ácido perclórico (7%) a 250 µL de soro plasmático, misturados e centrifugados a 600 g, 4 ° C, durante 20 minutos. O sobrenadante foi recolhido, adicionado a 400 µL de ácido tiobarbitúrico (0,6%), aquecido a 100 ° C durante 1 hora e lido a 532 nm. Uma curva padrão de MDA foi construída e os resultados foram expressos como nmol de MDA / mL (CAVALCANTI et al., 2016).

3.6 Procedimento cirúrgico para registro direto de PA em ratos machos aos 90 dias de idade.

Ratos (CTL, n = 8; DLP, n = 8) foram anestesiados com cetamina (80 mg / kg) e xilazina (10 mg / kg) para a inserção de cateteres de polietileno na artéria e veia femoral. Os cateteres foram tunelizados e exteriorizados na região anterior dorsal. Após o procedimento cirúrgico, foi administrado um anti-inflamatório (ketoprofeno, 5 mg / kg) por via subcutânea. Cada rato aguardou em recuperação por um período de 24 h após a cirurgia, até que os experimentos para obtenção dos registros de pressão arterial fossem iniciados (DE BRITO ALVES et al., 2015). A pressão arterial (PA) e a frequência cardíaca (FC) foram aferidas em animais conscientes, através da conexão entre o cateter arterial e um transdutor de pressão

para sinal elétrico, que alimentava um software de computador em plataforma Windows (LabChart 7 Pro, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Austrália).

3.7 Medições e análises da pressão arterial e avaliação cardiorrespiratória

A pressão pulsátil (PAP) foi registrada durante 40-50 min em condições basais, e os valores da pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e FC foram calculados a partir da seleção de um trecho de 10min do registro, para cada animal. Este mesmo período foi utilizado para obtenção do eletrocardiograma (ECG) e dos dados usados para a análise espectral.

Quarenta minutos após do registro cardiovascular, as medidas de frequência respiratória (FR) foram realizadas usando o método de pletismográfica do corpo inteiro (MALAN, 1973). Onde foi possível criar uma atmosfera controlada para o animal. Cada rato foi submetido a curtos períodos (3 min) de confinamento na caixa hermeticamente fechada e os dados respiratórios foram captados por um transdutor diferencial de pressão, conectado a um amplificador de sinal (ML141 Spirometer, PowerLab; ADInstruments).

Depois de registrar os parâmetros cardiorrespiratório basais, foi feita uma “lavagem” da câmara pletismográfica com uma mistura de gás hipercápnico (7% de CO₂, 21% de equilíbrio de O₂ e N₂, Linde Gás), conforme descrito anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (DE BRITO ALVES et al., 2014).

A FR, o volume corrente (VC) e a ventilação minuto (VE) foram determinados na condição de ar ambiente (basal) e após hipercapnia. Um período de 10 s foi selecionado para a determinação da FR média. O VC foi calculado utilizando a fórmula descrita anteriormente por Malan (MALAN, 1973) e a VE adquirida através do produto FR x VC.

Análise dos valores de PAM e FC foi realizada durante o fluxo da mistura hipercápnica. Um período de 30 s de PA e FC foi selecionado em 1, 2, 3, 4 e 5 min de fluxo de gás.

Dez minutos após os estímulos hipercápnicos, o quimiorreflexo periférico foi ativado através da injeção intravenosa de cianeto de potássio (KCN, 40 mg / 100 mL por rato, Merck) de acordo com trabalhos anteriores (DE BRITO ALVES et al., 2015; FRANCHINI; KRIEGER, 1993). A diferença entre PAM, FC e FR basais e o pico apreciado após o estímulo (Δ MAP; Δ HR e Δ RF) foi avaliado para análise, respectivamente, componente simpático, parassimpático e respiratório.

Por fim, 10 min após a ativação do quimiorreflexo periférico, a contribuição do tônus vascular simpático para o sistema cardiovascular foi avaliado por meio da administração intravenosa de um bloqueador ganglionar (hexametônio, 30 mg.kg⁻¹, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA). O tônus simpático foi calculado pela diferença entre o PAM após o bloqueador e a PAM basal. Todos os dados foram analisados com o uso de software apropriado (LabChart 7 Pro; ADInstruments) e no final dos experimentos, os animais foram eutanasiados com uma superdosagem endovenosa de cetamina (0,5 ml).

3.8 Análise do ECG

Os registros de ECG foram processados por *software* de computador (módulo de análise ECG para *LabChart Pro; ADInstruments*) para detecção automática das ondas R e cálculo “beat-by-beat” do intervalo RR. Para a detecção de ECG foi utilizado 12 ms para a largura típica do QRS e para as ondas R, pelo menos, 100 ms de distância. Para a análise ECG foi utilizada 70 ms para PR máximo e 90 ms para RT máximo.

3.9 Análise espectral

A avaliação autonômica cardiovascular foi realizada utilizando a análise de domínio de frequência do SAP e do intervalo de pulso (PI) por um programa de software apropriado (*CardioSeries-v.2.4*; www.danielpenteado.com). Os espectros foram integrados nas bandas LF (0,2-0,75 Hz) e HF (0,75-3 Hz). Para avaliar o índice simpatovagal, calculou-se a relação LF / HF da variabilidade. Além disso, a sensibilidade barorreflexa espontânea foi calculada através de um método de sequência.

3.10 Análise estatística

Cada grupo experimental incluiu pelo menos um ou dois animais de cada prole. O teste de *Bartlett* foi realizado para avaliar a homogeneidade de dados em parâmetros respiratórios e cardiovasculares, e os resultados estatísticos apoiaram o uso de testes t de *Student* não pareado. A análise estatística foi realizada com o programa *GraphPad Prism 5* para Windows (*GraphPad Software®. Inc., La Jolla, CA, EUA*). Os valores são apresentados como significativos e os meios de erro padrão (S.E.M.) e os valores de $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ingestão dietética, peso corporal e perfil metabólico em ratas alimentadas com dieta dislipidêmica durante a gestação e lactação

Analisando o consumo alimentar e o ganho de peso corporal, apesar de reduzida ingestão alimentar nas últimas duas semanas de lactação, não houve diferença no ganho de peso corporal durante a gestação e lactação entre as ratas dos grupos CTL e DLP (Figura 1).

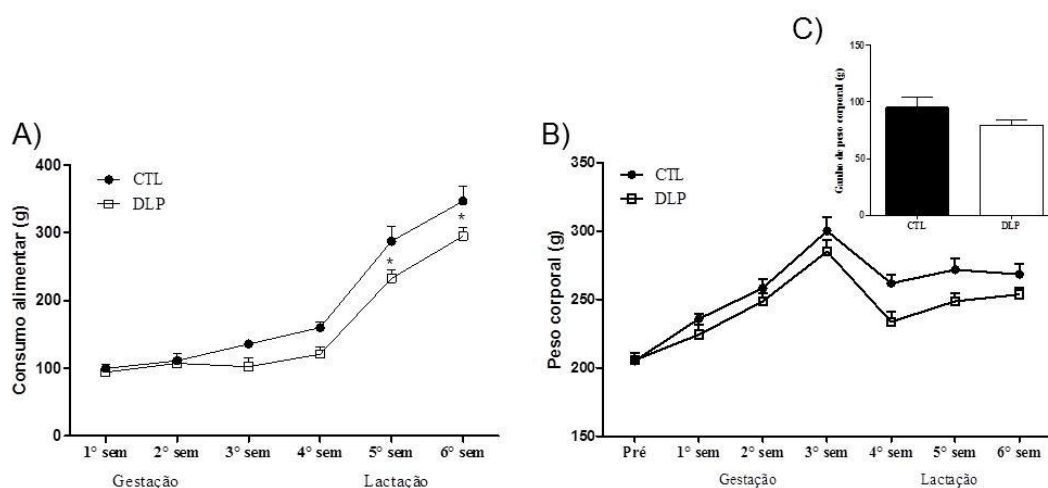


Figura 1. Avaliação da ingestão alimentar (A), peso corporal (B) e ganho total de peso corporal (C) em ratas que receberam uma dieta controle ou dislipidêmica durante a gestação e lactação. Grupos: controle (CTL, n = 5) e grupo dislipidêmico (DLP). Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$ indica diferença estatística usando ANOVA two-way, seguido do teste post hoc de Bonferroni ou do teste t de Student.

Conforme observado na Figura 2, após o período de lactação, as ratas DLP apresentaram níveis séricos significativamente elevados de CT, triglicerídeos, VLDL + LDL e redução de HDL quando comparado com as ratas CTL. Observa-se também que os índices aterogênicos (triglicerídeo / HDL, CT / HDL e VLDL + LDL / HDL) foram aumentados nas mães DLP ($P < 0,05$, Figura 2B).

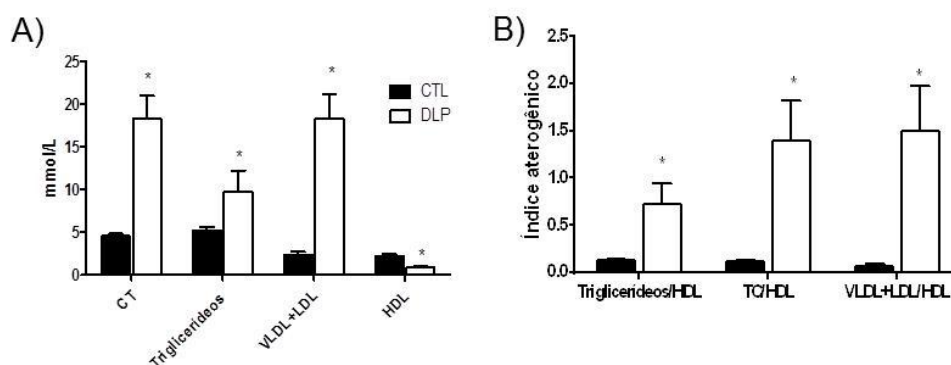


Figura 2. Avaliação dos níveis séricos de colesterol total, triglicerídeos, LDL, e HDL (A) e dos índices aterogênicos Triglicerídeo/HDL, CT/HDL e VLDL+LDL/HDL (B) ao final da lactação de ratas que receberam uma dieta controle ou dislipidêmica durante a gestação e lactação. Grupos: controle (CTL, n = 5) e Grupo dislipidêmico (DLP). Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$ indica diferença estatística usando o teste t de Student.

Adicionalmente, realizamos TOTG e TTI para avaliar se a dieta dislipidêmica exerceria algum efeito sobre a homeostase da glicose. Conforme mostrado na Figura 3A, mães DLP apresentaram concentração elevadas de glicose plasmática aos 15 ($9,7 \pm 1,7$ vs. $6,2 \pm 0,4$ mmol / L, $P < 0,05$) e 30 min ($9,2 \pm 0,8$ vs. $6,3 \pm 0,5$ mmol / L, $P < 0,05$) no TOTG quando comparadas com as controles. O grupo DLP, também apresentou maior área sob a curva (ASC) até os 90 min do TOTG ($P < 0,05$, Figura 3A). Semelhantemente, no TTI o grupo DLP apresentou maior concentração sérica de glicose aos 30 ($3,4 \pm 0,16$ versus $2,2 \pm 0,21$ mmol / L, $P < 0,05$) e 120 min, ($3,12 \pm 0,56$ versus $1,5 \pm 0,19$ mmol / L, $P < 0,05$) assim como maior ASC aos 120 min, após o início do teste ($P < 0,05$, Figura 3B).

Nossos resultados corroboram com estudos anteriores, os quais relataram que o alto consumo dietético de gordura, colesterol e açúcar durante a gestação (MUSIAL et al., 2017; EL-SAYYAD et al., 2014) ou lactação (TSUDUKI et al., 2016) prejudicam o metabolismo de lipídios e glicose materno.

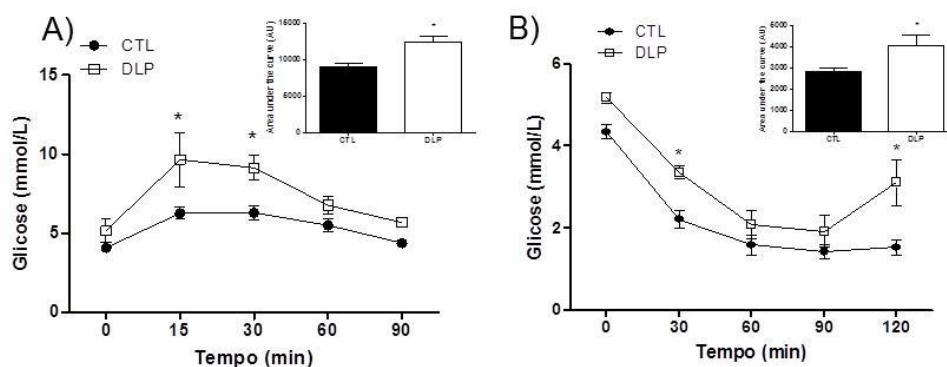


Figura 3. Teste oral de tolerância à glicose (A) e teste de tolerância à insulina (B) ao final da lactação em ratas que receberam uma dieta controle ou dislipidêmica durante a gestação e lactação. Grupos: controle (CTL, n = 5) e Grupo dislipidêmico (DLP). Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$ indica diferença estatística usando o teste t de Student.

Associado ao quadro de dislipidemia e resistência à insulina, ratas alimentadas com dieta dislipidêmica apresentaram elevados níveis de lipídio hepático, quando comparado com as ratas do grupo CTL (Figura 4).

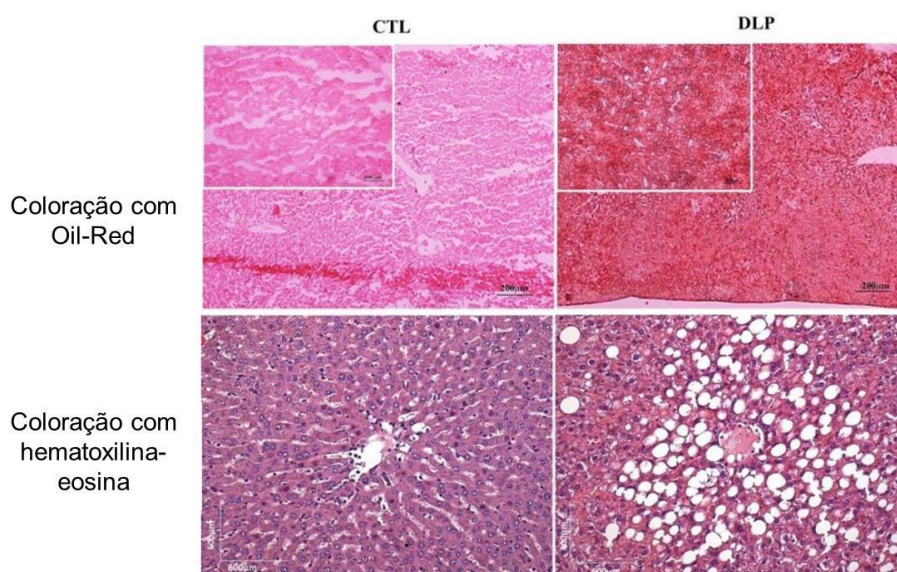


Figura 4. Avaliação histopatológica hepática em ratas CTL e DLP ao final da lactação.

Nossos resultados demonstram que ratas alimentadas com uma dieta dislipidêmica durante a gestação e lactação apresentam altos níveis de CT, triglicerídeos, além de elevado índice de aterogenicidade, comprometimento do metabolismo da glicose e esteatose hepática ao desmame. Essas descobertas sugerem que um consumo excessivo de ácidos graxos trans,

saturados e colesterol durante a gravidez e a lactação, pode ser um modelo experimental útil para estudar os efeitos da dislipidemia em ratas genitoras e sua prole.

4.2 Efeitos de curto prazo (30 dias de idade) da dislipidemia materna sob parâmetros somáticos e bioquímicos da prole

A Figura 5 mostra as curvas de crescimento somático, do nascimento (21 dias) até os 90 dias de idade. O peso corporal dos ratos expostos à dislipidemia materna foi menor no nascimento ($5,2 \pm 0,08$ vs. $5,6 \pm 0,1$ g, $P < 0,05$, Figura 5) e no desmame, ($39,5 \pm 0,7$ vs. $44,5 \pm 0,6$ g, $P < 0,05$, Figura 5) quando comparado ao grupo CTL. No entanto, nenhuma diferença foi observada no comprimento ou índice de Lee. Do desmame até os 60 dias, o peso corporal foi semelhante entre os grupos. No entanto, aos 90 dias (ratos adultos), os ratos DLP apresentaram peso corporal significativamente maior ($362 \pm 4,7$ vs. $336 \pm 4,9$ g, $P < 0,05$, Figura 5) em comparação com os ratos CTL. Apesar das alterações no peso corporal, nenhuma diferença foi observada no comprimento naso-caudal e índice de Lee. O tecido adiposo corporal não foi mensurado, não sendo possível, afirmar que a prole DLP apresentou obesidade na idade adulta. Em pesquisas posteriores, serão feitas investigações que ajudem a elucidar essa lacuna.

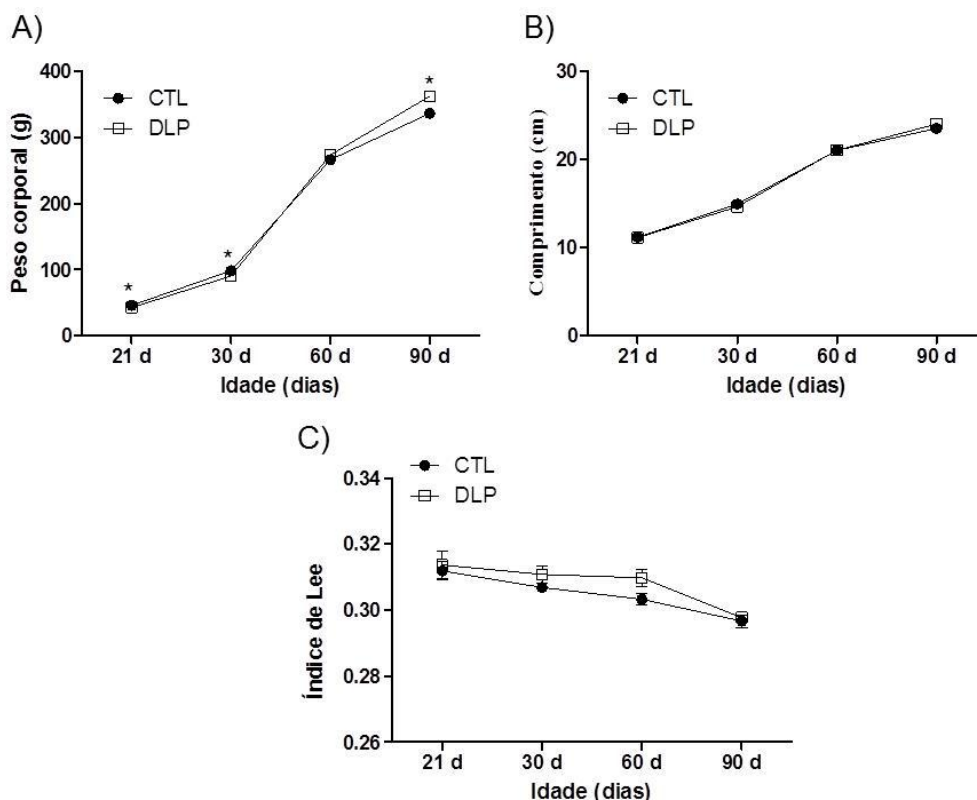


Figura 5. Peso corporal (A), comprimento naso-anal (B) e índice de Lee (C) na prole de ratos machos expostos à dislipidemia materna durante a gestação e lactação. Grupos: controle (CTL, n = 20) e grupo dislipidêmico (DLP, n=20). Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média. *P <0,05 indica diferença estatística usando o teste ANOVA tow-way, seguido do teste post hoc de Bonferroni ou o teste t de Student.

Nossos resultados corroboram com estudos prévios, onde filhotes de mães alimentadas com dieta ocidentalizada exibiram baixo peso ao nascer e ao desmame (MUSIAL et al., 2017; EI-SAYYAD et al., 2014). Curiosamente, uma recente meta-análise de ensaios clínicos constatou que a dislipidemia materna durante a gravidez estava associada a um risco aumentado de parto prematuro e maior risco de baixo peso ao nascer (JIANG et al., 2017).

O TOTG foi utilizado para verificação de possíveis alterações no metabolismo da glicose. O grupo DLP mostrou um aumento da glicemia aos 15 minutos ($4,3 \pm 0,3$ vs. $3,5 \pm 0,19$ mmol / L, P <0,05, Fig. 5) e uma tendência para uma maior ASC (P = 0,06, Figura 6). Já a concentração de glicose sérica em jejum, foi semelhante entre os grupos (P > 0,05, Figura 7).

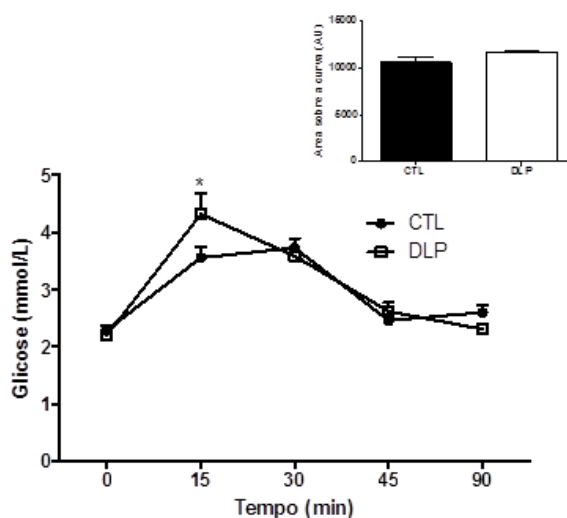


Figura 6. Teste oral de tolerância à glicose na prole de ratos machos aos 30 dias de vida de mães expostas à dislipidemia materna durante a gestação e lactação. Grupos: controle (CTL, n = 8) e grupo dislipidêmico (DLP, n=8). Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média. *P <0,05 indica diferença estatística usando o teste ANOVA two-way, seguido do teste post hoc de Bonferroni ou o teste t de Student.

O perfil lipídico sérico dos descendentes machos revelou que as concentrações de CT e VLDL foram maiores no grupo DLP (P <0,05, Figura 7). As concentrações de triglicerídeos e colesterol HDL, no entanto, foram semelhantes entre os grupos (Figura 7). Demonstrou-se em outros estudos que a tolerância à glicose prejudicada, associada a altos níveis séricos de CT, triglicerídeos e esteatose hepática são observados em ratos descendentes de ratas alimentadas com dieta hiperlipídica ou hipercolesterolêmica durante a gestação ou lactação (TSUDUKI et al., 2016; SUN et al., 2012). Essas alterações podem ocorrer como consequência do alto teor de colesterol e gordura presente no leite materno (TSUDUKI et al., 2016).

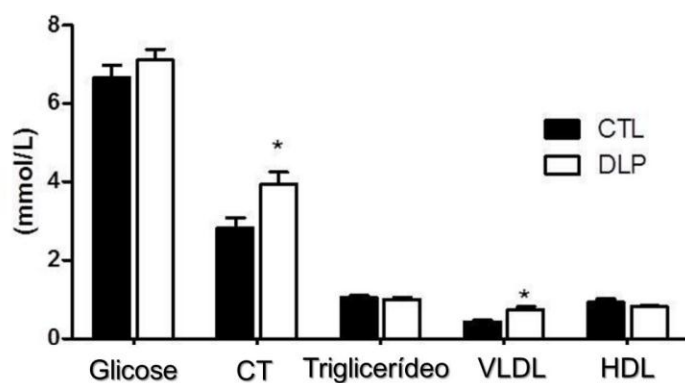


Figura 7. Avaliação dos níveis séricos de glicose, colesterol total (CT), triglicerídeos, VLDL, e HDL na prole de ratos machos aos 30 dias de vida de mães expostas à dislipidemia materna durante a gestação e lactação. Grupos: controle (CTL, n = 8) e grupo dislipidêmico (DLP, n=8). Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média. *P <0,05 indica diferença estatística usando o teste ANOVA tow-way, seguido do teste post hoc de Bonferroni ou o teste t de Student.

4.3 Efeitos em longo prazo da dislipidemia materna sobre os parâmetros bioquímicos e cardio-respiratórios na prole de ratos machos

Investigando os efeitos em longo prazo da dislipidemia materna sobre a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina (80 dias de nascido), nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos CTL e DLP (P> 0,05, Figura 8).

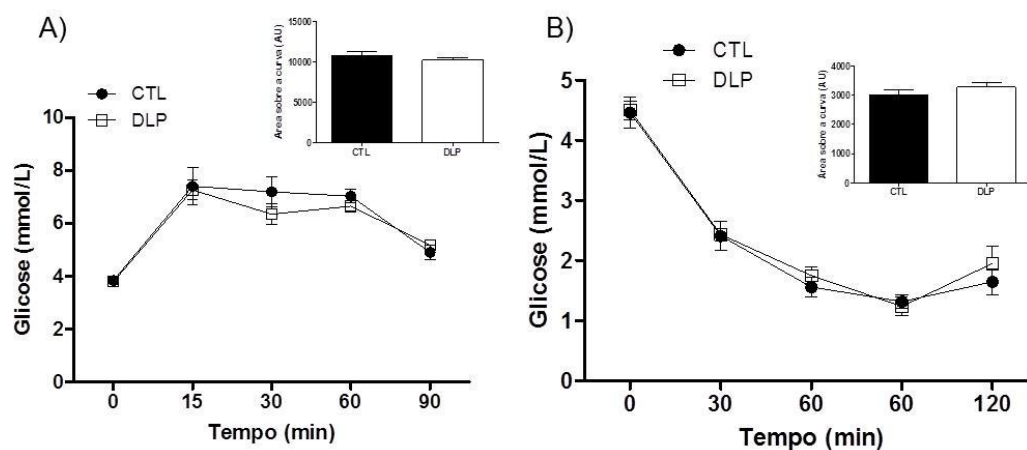


Figura 8. Teste oral de tolerância à glicose (A) e teste de tolerância à insulina (B) na prole de ratos machos aos 80 dias de vida de mães expostas à dislipidemia materna durante a gestação e lactação. Grupos: controle (CTL, n = 8) e grupo dislipidêmico (DLP, n=8). Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média. *P <0,05 indica diferença estatística usando o teste ANOVA tow-way, seguido do teste post hoc de Bonferroni ou o teste t de Student.

De maneira semelhante, os níveis sérios de glicose, CT, triglicerídeos, VLDL e HDL foram semelhantes entre os grupos CTL e DLP (P>0,05, Figura 9).

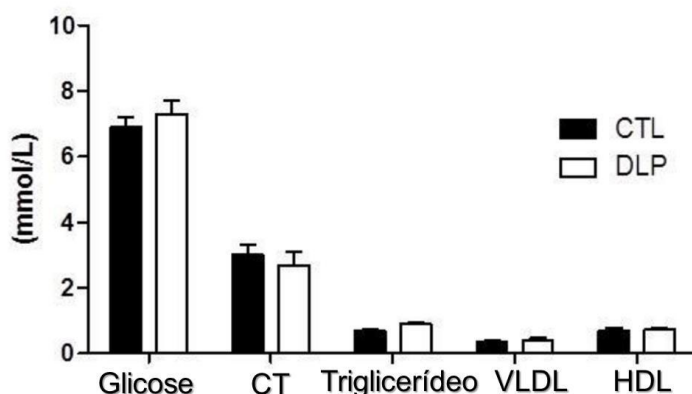


Figura 9. Avaliação dos níveis séricos de glicose colesterol total (CT), triglicerídeos, VLDL, e HDL na prole de ratos machos aos 80 dias de vida de mães expostas à dislipidemia materna durante a gestação e lactação. Grupos: controle (CTL, n = 8) e grupo dislipidêmico (DLP, n=8). Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média. *P <0,05 indica diferença estatística usando o teste ANOVA tow-way, seguido do teste post hoc de Bonferroni ou o teste t de Student.

A figura 10 mostra um traçado representativo do registro de pressão arterial pulsátil (PAP), PAM e FC de ratos dos grupos CTL e DLP.

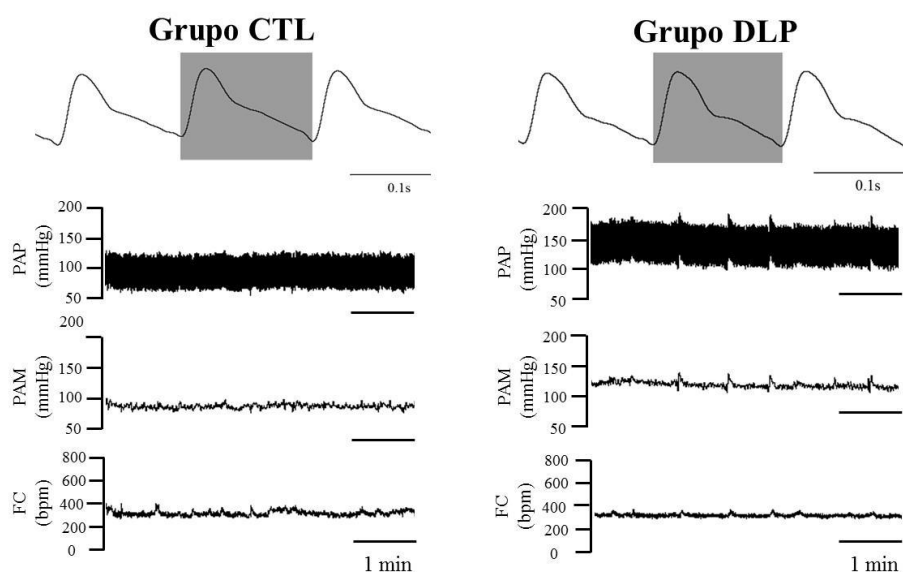


Figura 10. Registro representativo da PAP, PAM e FC de ratos CTL e DLP.

Após análise de registros de pressão arterial na prole de ratos machos aos 90 dias de vida, observou-se que o grupo DLP exibiu aumento em PAS, PAD e PAM em comparação ao CTL (P <0,05; Tabela 2), caracterizando-os estatisticamente como hipertenso. Nossos resultados foram semelhantes ao de outro estudo, o qual utilizou uma dieta materna hiperlipídica como modelo experimental (VIDAL-SANTOS et al., 2017).

No entanto, outro estudo, o qual induziu hipercolesterolemia em ratas durante a gestação, observou-se que seus descendentes não desenvolveram hipertensão aos 90 dias de idade (DE ASSIS; SEGURO; HELOU, 2013). Porém, é digno de nota que a pressão arterial foi medida em ratos anestesiados, limitando a comparação com os resultados aqui descritos.

A hipertensão arterial observada em nosso estudo não foi associada à taquicardia, como evidenciado pela FC basal entre os grupos CTL e DLP ($P > 0,05$, Tabela 2). A análise espectral feita a partir de registros de pressão arterial basal demonstrou que a faixa LF da PAS e a relação LF / HF do PI foram aumentadas no grupo DLP ($P < 0,05$; Tabela 2).

Em relação à sensibilidade barorreflexa espontânea, ambos os ratos CTL e DLP apresentaram ganho barorreflexo semelhante ($P > 0,05$, Tabela 2). Foi relatado em um estudo, que uma disfunção barorreflexa poderia levar a uma hiperatividade simpática e subsequente desenvolvimento de hipertensão (MEGURO et al., 1989). Porém, aqui não foi encontrada diferença entre os grupos, sugerindo que o controle barorreflexo, pelo menos dentro da faixa estreita das variações fisiológicas da pressão arterial, não é alterado em ratos adultos expostos a dislipidemia materna. Medidas de ECG analisadas, tais como os intervalos RR, PR, QRS e QT e a duração da onda P, não apresentaram diferença entre os ratos do grupo CTL e DLP ($P > 0,05$, Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros basais de pressão cardíaca, análise espectral e ECG

Prole de ratos machos		
Parâmetros cardiovasculares	Grupo CTL	Grupo DLP
PAS (mmHg)	127±7.3	155±5*
PAD (mmHg)	74±7	103±1.8*
PAM (mmHg)	90±5.5	121±2.9*
FC (bpm)	361±14	346±16
Análise Espectral		
LF (mmHg ²)	4.8±0.4	9.0±0.9*
HF (mmHg ²)	5.9±1.3	3.0±0.4
LF/HF	0.13±0.02	0.29±0.007*
BRS (ms/mmHg)	1.18±0.14	1.21±0.10
Análise do ECG		
Interval RR (s)	0.165±0.003	0.171±0.014
Intervalo PR (s)	0.049±0.002	0.047±0.001
Duração da onda P (s)	0.031±0.002	0.028±0.001
Intervalo QRS (s)	0.033±0.002	0.034±0.002
Intervalo QT (s)	0.085±0.004	0.083±0.006

BRS: Barorreflexo espontâneo

Para testar a hipótese que o tônus simpático estaria aumentado em ratos DLP aos 90 dias, nós avaliamos as alterações na PAM (Δ MAP) após a administração de um fármaco bloqueador ganglionar (hexametônio) em ambos os grupos. Após o bloqueio, os ratos DLP mostraram aumento Δ MAP ($P < 0,05$; Figura 11) quando comparado com ratos CTL.

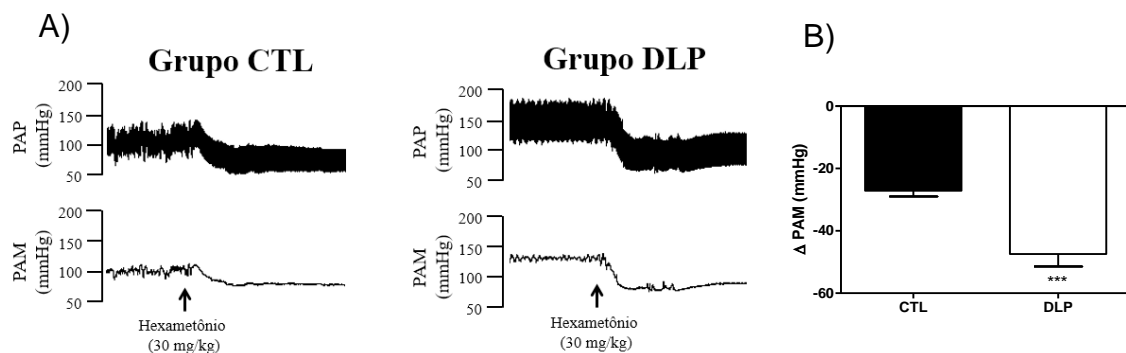


Figura 11. Traçados representativos da pressão arterial pulsátil (PAP) e pressão arterial média (MAP) após hexametônio (A) e do delta de PAM na prole de ratos machos aos 90 dias de vida de mães expostas à dislipidemia materna durante a gestação e lactação. Grupos: controle (CTL, n = 8) e grupo dislipidêmico (DLP, n=8). Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$ indica diferença estatística usando o teste ANOVA two-way, seguido do teste post hoc de Bonferroni ou o teste t de Student.

Juntos, nossos resultados sustentam a hipótese de que a hipertensão arterial observada em ratos machos expostos à dislipidemia materna durante o período perinatal, está associada à hiperatividade simpática. É interessante notar que o aumento em LF, no índice de LF / HF e a grande variação da PAM após a infusão de hexametônio, são observados em ratos (BARROS et al., 2015) e na fase inicial de hipertensão em homens (CARTHY, 2014). É bem aceito que a disfunção autonômica, verificada quando há excesso de tônus simpático e retirada vagal, alteram a reatividade vascular, contribuindo para o desenvolvimento de hipertensão, tanto em modelos experimentais quanto clínicos (ZOCCAL et al., 2008; SIMMS et al., 2009; DE BRITO ALVES et al., 2015; GRASSI, 1998). Para melhor entendimento dos possíveis mecanismos subjacentes à hiperatividade simpática observada, investigamos potenciais alterações ventilatórias e de quimiossensibilidade em nosso modelo.

A figura 12 mostra um traçado representativo da frequência respiratória em condições basais e após exposição à hipercapnia de ratos CTL e DLP aos 90 dias de vida.

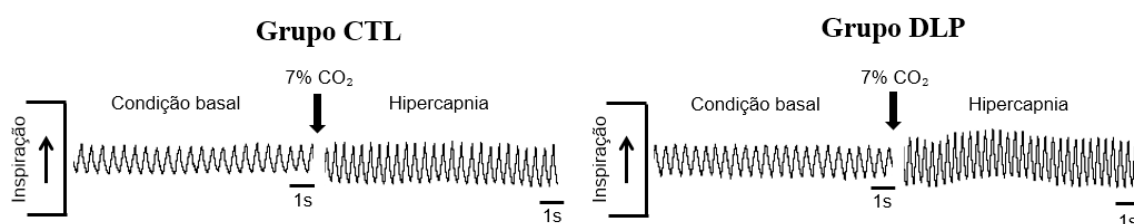


Figura 12. Traçado respiratório representativo em condições basais e após exposição à hipercapnia em ratos machos CTL e DLP aos 90 dias de vida.

Em condições basais, os valores de FR, VC e VE foram semelhantes entre os grupos CTL e DLP ($P > 0,05$; Figura 13 A-C). A hipercapnia (CO_2 7%) produziu um aumento nos valores de FR, VC e VE nos grupos CTL e DLP. Em comparação com os descendentes das ratas CTL, os ratos DLP apresentaram variações mais altas de ΔFR e ΔVE , mas nenhuma diferença nos valores de ΔVT (Figura 13 D-F) após a hipercapnia. Além disso, durante os 5 min de infusão de gás hipercápnico, a PAM (Figura 13G) foi aumentada no grupo DLP quando comparado com o grupo CTL, mas nenhuma diferença na FC foi observada (Figura 13 H).

O início da vida é considerado um período crítico relevante para os ajustes no controle quimiossensorial da respiração. Neste período, a rede neural respiratória ainda é imatura e incapaz de montar uma defesa efetiva contra os desafios respiratórios ambientais (BAVIS; MACFARLAME, 2017).

Uma série de fatores ambientais como estresse ou o nível de oxigênio experimentados no início da vida, pode provocar a curto ou em longo prazo, plasticidade do desenvolvimento no sistema de controle respiratório, o que por sua vez pode se expressar por meio de mudanças na ventilação pulmonar ou na ventilação frente a estímulos hipóxicos ou hipercápnicos (HILL; GRANDGEORGE; BAVIS, 2013; BAVIS; MACFARLAME, 2017).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que os insultos nutricionais durante a gestação e a lactação podem impactar sobre o desenvolvimento do fenótipo respiratório, podendo causar alterações na ventilação basal e na resposta ventilatória à hipercapnia (DE BRITO ALVES et al., 2014). Aqui, demonstramos que as respostas reflexas ventilatórias e cardiovasculares à hipercapnia foram significativamente maiores em ratos machos expostos a dislipidemia durante a gestação e lactação.

Analisando a quimiossensibilidade periférica, demonstramos que ativação de quimiorreceptores periféricos produziu respostas pressóricas, bradicardia e taquipnéia em ambos os grupos (Figura 14A). Interessantemente, a resposta da PAM ($P < 0,05$; Figura 14B) e FR ($P < 0,05$; Figura 14C) foram significativamente maiores no grupo DLP em comparação ao grupo CTL. Em contraste, a magnitude da diminuição da FC mostrou tendência para redução nos ratos DLP ($P = 0,05$, Figura 14 D). Juntos, esses resultados sugerem que a prole DLP apresentou maior sensibilização de quimiorreceptores cardiorrespiratórios.

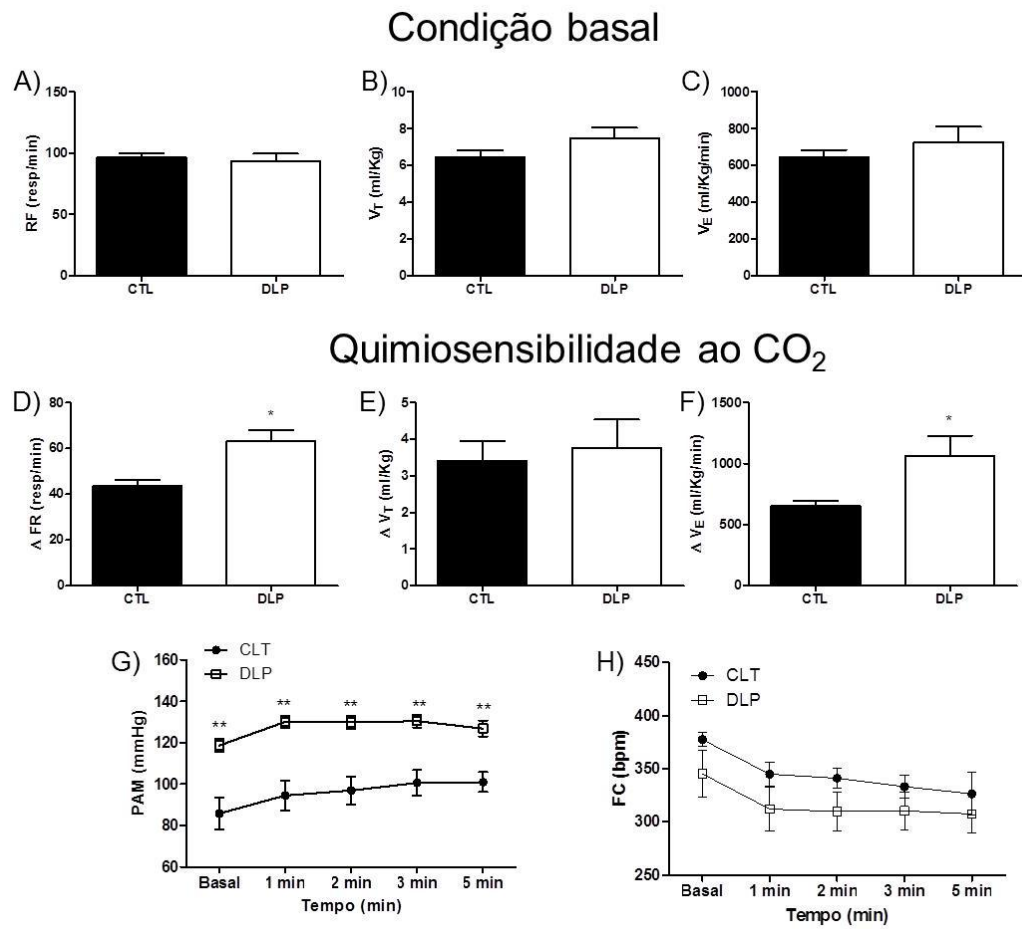


Figura 13. Frequência respiratória (A), volume corrente (B), ventilação minuto (C) em repouso e após hipercapnia (D, E e F). Durante os cinco minutos de hipercapnia, os valores de PAM e FC foram registrados na prole de ratos machos aos 90 dias de vida de mães expostas à dislipidemia materna durante a gestação e lactação. Grupos: controle (CTL, n = 8) e grupo dislipidêmico (DLP, n=8). Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média. *P <0,05 indica diferença estatística usando o teste ANOVA tow-way, seguido do teste post hoc de Bonferroni ou o teste t de Student.

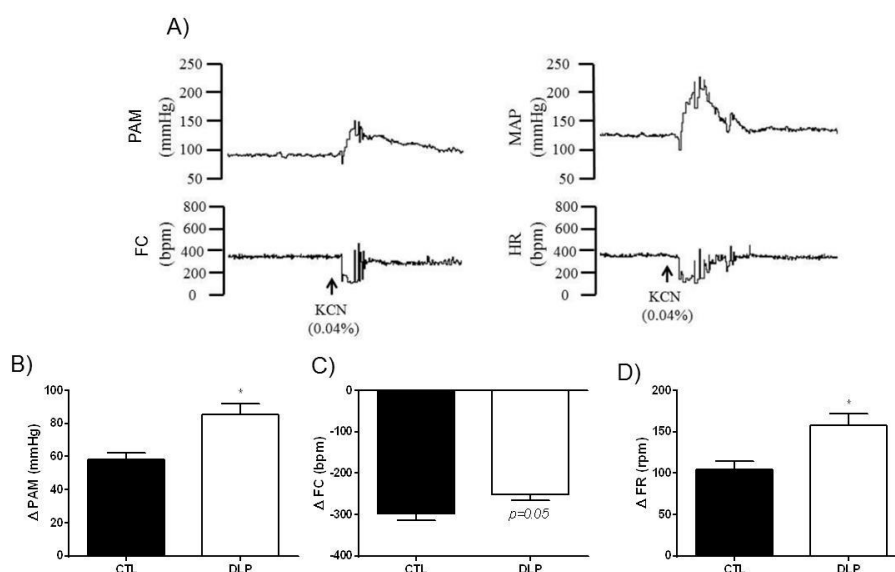


Figura 14. Registro representativo da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) durante a ativação do quimiorreflexo periférico (A) e avaliação da variação de PAM (B), FC (C) e FR (D) na prole de ratos machos aos 90 dias de vida de mães expostas à dislipidemia materna durante a gestação e lactação. Grupos: controle (CTL, n = 8) e grupo dislipidêmico (DLP, n=8). Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média. *P <0,05 indica diferença estatística usando o teste ANOVA tow-way, seguido do teste post hoc de Bonferroni ou o teste t de Student.

Estudos clínicos e experimentais mostraram que níveis elevados de marcadores inflamatórios e de espécies reativas de oxigênio (ROS) são encontrados no plasma e placenta de mulheres grávidas com transtornos metabólicos ou obesidade (ZAMBRANO et al., 2016), podendo prejudicar o funcionamento da placenta e induzir efeitos adversos ao feto (ROBERTS et al., 2011; MYATT; MALOYAN, 2016).

Um estudo recente mostrou que a inflamação altera os padrões da respiração e aumenta a resposta ventilatória ao CO_2 (FORSBERG et al., 2016). Curiosamente, Samarasinghe e colegas demonstraram que as respostas ventilatórias à hipoxia e à hipercapnia foram intensificadas em descendentes de ratos expostos à inflamação pré-natal nos últimos dias de gestação (SAMARASINGHE et al., 2015).

Em adição, prévios estudos apontam que o estresse oxidativo aumenta a sensibilidade quimiorreflexa em ratos expostos a hipóxia intermitente crônica (MORGAN et al., 2016). Nesse contexto, verificamos se elevados níveis de MDA (um biomarcador usado para avaliar o estresse oxidativo) poderia estar associado com os distúrbios cardiorrespiratórios e de quimiossensibilidade observados em nosso trabalho. Para nossa surpresa, os níveis séricos de MDA foram aumentados aos 30 e 90 dias de vida em ratos expostos à dislipidemia durante a gestação e lactação (Figura 15).

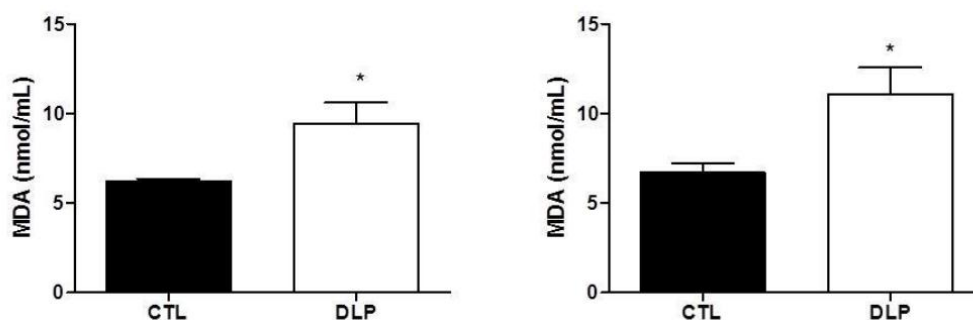


Figura 15. Concentrações séricas de MDA aos 30 dias (A) e 90 dias de vida (B) na prole de ratos machos de mães expostas à dislipidemia materna durante a gestação e lactação. Grupos: controle (CTL, n = 8) e grupo dislipidêmico (DLP, n=8). Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média. *P <0,05 indica diferença estatística usando o teste ANOVA tow-way, seguido do teste post hoc de Bonferroni ou o teste t de Student

5 CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou que o ambiente materno dislipidêmico contribui para desenvolvimento de hipertensão arterial na prole de ratos adultos, tendo como provável causa a hiperatividade simpática decorrente do aumento de quimiossensibilidade central e periférica. Além disso, alterações metabólicas glicídicas e lipídicas séricas foram encontradas nos ratos aos 30 dias de idade, as quais não mantiveram-se na fase adulta, no entanto, é interessante notar que o nível de malonaldeído sérico se manteve elevado na prole DLP, tanto aos 30 quanto aos 90 dias de vida. Esses achados são de grande valia para a busca do entendimento das consequências da dislipidemia materna sobre os parâmetros cardiovasculares e metabólicos na prole e na mãe.

Mais evidências são relevantes para consolidar o conhecimento acerca do modelo de hipertensão estudado. Neste sentido, pretendemos continuar nossas investigações voltadas para outros órgãos que participam do controle da pressão arterial, como o barorreceptor (utilizando-se metodologias de maior acurácia) e outros marcadores bioquímicos de estresse oxidativo, que pode estar envolvido em alterações fisiológicas do sistema cardiorrespiratório. Além disso, investigaremos os parâmetros cardiorrespiratórios e metabólicos na prole fêmea, pois não é sabido se há influência de dimorfismo de gênero neste modelo.

REFERÊNCIAS

- ANVISA. Dislipidemia. **Saúde e Economia**, Brasília, ano 3, n.6, out. 2011. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33884/412285/Boletim+Sa%C3%BAde+e+Economia+n%C2%BA+6/a26c1302-a177-4801-8220-1234a4b91260>> acesso em 3 de outubro de 2017.
- BAVIS, R. W.; MACFARLANE, P. M. Developmental plasticity in the neural control of breathing. **Experimental neurology**, v.287, n.2, p.176-191, 2017.
- BAHADORAN, Z.; MIRMIRAN, P.; AZIZI, F. Fast food pattern and cardiometabolic disorders: A review of current studies. **Health Promotion Perspectives**, v.5, n.4, p.231-240, 2015.
- BAYNE, K. Revised guide for the care and use of laboratory animals available. American Physiological Society. **The Physiologist**, v.39, n.4, p.208-211, 1996.
- BARROS, M. A. et al. Maternal low-protein diet induces changes in the cardiovascular autonomic modulation in male rat offspring. **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases**, v.25, n.1, p.123-130, 2015.
- BIELEMANN, R. M. et al. Consumo de alimentos ultraprocessados e impacto na dieta de adultos jovens. **Revista de saúde pública**, v.49, n.28, p.1-10, 2015.
- BUETTNER, R; SCHOLMERICH, j.; BOLLHEIMER, L. C. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity**, v.15, n.4, p.798-808, 2007.
- CAVALCANTI, C. DE O. et al. Inhibition of PDE5 Restores Depressed Baroreflex Sensitivity in Renovascular Hypertensive Rats. **Frontiers in Physiology**, v.7, a.15, 2016.
- CATAPANO, A. L. et al. ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidemias: The Task Force for the Management of Dyslipidemia of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). **European Heart Journal**, v. 37, n.39, p.2999-3058, 2016.
- CARTHY, E. R. Autonomic dysfunction in essential hypertension: A systematic review. **Annals of medicine and surgery**, v.3, n.1, p.2-7, 2014.

CHAN, S. H. H.; CHAN, J. Y. H. Brain stem oxidative stress and its associated signaling in the regulation of sympathetic vasomotor tone. **Journal of Applied Physiology**, v.113, n.12, p.1921-1928, 2012.

COSTA-SILVA, J. H.; SIMÕES-ALVES, A. C.; FERNANDES, M. P. Developmental origins of cardiometabolic diseases: role of the maternal diet. **Frontiers in physiology**, v.7, a.504, p., 2016.

DE BRITO ALVES, J. L. et al. Maternal protein restriction increases respiratory and sympathetic activities and sensitizes peripheral chemoreflex in male rat offspring. **The Journal of nutrition**, v.145, n.5, p.907-914, 2015.

DE BRITO ALVES, J. L. et al. Short- and long-term effects of a maternal low-protein diet on ventilation, O₂/CO₂ chemoreception and arterial blood pressure in male rat offspring. **The British journal of nutrition**, v.111, n.4, p.606-615, 2014.

DE BRITO ALVES, J. L. et al. Maternal protein restriction induced-hypertension is associated to oxidative disruption at transcriptional and functional levels in the medulla oblongata. **Clinical and Experimental Pharmacology Physiology**, v.43, n.12, p.1177-1184, 2016.

DEL RIO, R. et al. Carotid body inflammation and cardiorespiratory alterations in intermittent hypoxia. **European Respiratory Journal**, v.39, n.6, p.1492-1500, 2012.

DE ASSIS, S. M.; SEGURO, A. C.; HELOU, C. M. Effects of maternal hypercholesterolemia on pregnancy and development of offspring. **Pediatric nephrology**, v.18, n.4, p.328-334, 2003.

DO NASCIMENTO, I. B. et al. Excesso de peso e dislipidemia e suas intercorrências no período gestacional: uma revisão sistemática. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v.16, n.2, p.103-111, 2016.

ECKARDSTEIN, A. V.; SIBLER, R. A. Possible contributions of lipoproteins and cholesterol to the pathogenesis of diabetes mellitus type 2. **Current opinion in lipidology**, v.22, n.1, p.26-32, 2011.

EI-SAYYAD, H. I. et al. Effect of maternal diabetes and hypercholesterolemia on fetal liver of albino Wistar rats. **Nutrition**, v.30, n.3, p.326-336, 2014.

FALUDI, A. A. et al. Atualização da diretriz Brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose – 2017. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**. v. 109, n. 2, Supl. 1, p.1-76 2017.

FORSBERG, D. et al. CO₂-evoked release of PGE₂ modulates sighs and inspiration as demonstrated in brainstem organotypic culture. **Elife**, v.5, n.5, p., 2016.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical chemistry**, v.18, n.6, p.499-502, 1972.

FRANCHINI, K.G.; KRIEGER, E. M. Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. **Journal of the autonomic nervous system**, v.42, n.1, p.63-69, 1993.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12^a ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed., 2012.

GRASSI, G. Role of the sympathetic nervous system in human hypertension. **Journal of hypertension**, v.16, n. 12, p.1979-1987, 1998.

HERRERA, E.; Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. **Endocrine**, v.19, n.1, p.43-55, 2002.

HILL, C. B.; GRANDGEORGE, S. H.; BAVIS, R. W. Developmental hyperoxia alters CNS mechanisms underlying hypoxic ventilatory depression in neonatal rats. **Respiratory physiology & neurobiology**, v.189, n.3, p.498-505, 2013.

JELLINGER, P. S. et al. American association of clinical endocrinologists and american college of endocrinology guidelines for management of dyslipidemia and presentation of cardiovascular disease. **Endocrine Practice**, v.23, suppl. 2, p.1-87, 2017.

JIANG, S. et al. Maternal dyslipidemia during pregnancy may increase the risk of preterm birth: A meta-analysis, **Taiwan journal of obstetrics & gynecology**, v.56, n.1, p.9-15, 2017.

LEE, HO-S. Impact of Maternal Diet on the Epigenome during in utero life and the developmental programming of diseases in childhood and adulthood. **Nutrients**, v.7, n.11, p.9492-9507, 2015.

KANG, Y. J. et al. Associations of obesity and dyslipidemia with intake of sodium, fat, and sugar among Koreans: a qualitative systematic review. **Clinical nutrition research**, v.5, n.4, p.290-304, 2016.

MACHADO, B. H.; ZOCCAL, D. B.; MORAES, D. J. A. Neurogenic hypertension and the secrets of respiration. **American journal of physiology regulatory, integrative and comparative physiology**, v.312, n.6, p.R864-R872, 2017.

MALAN, A. Ventilation measured by body plethysmography in hibernating mammals and in poikilotherms. **Respiration physiology**, v.17, n.1, p.32-44, 1973.

MALPAS, S. C. The rhythmicity of sympathetic nerve activity. **Progress in Neurobiology**, v.56, n.1, p.65-96, 1998.

MATTARAIA, V. G. M.; MOURA, A. S. A. M. T. Produtividade de ratos *Wistar* em diferentes sistemas de acasalamento. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.8, p. 1490-1496, 2012.

MEGURO, Y. et al. A sympathetic component of baroreflex function in patients with essential hypertension. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v.15, Supl.15, p.93-95, 1989.

MEHLEM, A. et al. Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. **Nature protocols**, v.8, n.6, p.1149-1154, 2013.

MENDONÇA, R. DE D. et al. Ultraprocessed food consumption and risk of overweight and obesity: the university of Navarra follow-up (SUN) cohort study. **The American journal of clinical nutrition**, v.104, n.5, p.1433-1440, 2016.

MILLS, K. T. et al. Global Disparities of Hypertension Prevalence and Control Clinical Perspective: A Systemic Analysis of Population-Based Studies From 90 Countries. **Circulation**, v.134, n.6, p.441-450, 2016.

MORGAN, B. J. et al. Oxidative stress augments chemoreflex sensitivity in rats exposed to chronic intermittent hypoxia. **Respiratory physiology & neurobiology**, v.234, n., p.47-59, 2016.

MUSIAL, B. et al. A Western-style obesogenic diet alters maternal metabolic physiology with consequences for fetal nutrient acquisition in mice. **The journal of physiology**, v.595, n.14, p.4875-4892, 2017.

MYATT, L.; MALOYAN, A. Obesity and Placental Function. **Seminars in reproductive medicine**, v.34, n.1, p.42-49, 2016.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of nutrition**, v.123, n.11, p.1939-1951, 1993.

ROBERTS, K. A. et al. Placental structure and inflammation in pregnancies associated with obesity. **Placenta**, v.32, n.3, p.247-254, 2011.

ROBERTS, V. H. et al. Effect of increasing maternal body mass index on oxidative and nitrative stress in the human placenta. **Placenta**, v.30, n.2, p.169-175, 2009.

ROUBER, F. et al. Consumption of ultra-processed food products and its effects on children's lipid profiles: A longitudinal study. **Nutrition metabolism and cardiovascular diseases**, v.25, n.1, p.116-122, 2015.

SAMARASINGHE, T. D. et al. The effect of prenatal maternal infection on respiratory function in mouse offspring: evidence for enhanced chemosensitivity. **Journal of Applied physiology**, v.119, n.3, p.299-307, 2015.

SEE-LING, L.; SIRAJUDEEN, K. N. S.; HAMID JAN, J. M. Increase in maternal adiposity and poor lipid profile is associated with oxidative stress markers during pregnancy. **Preventive medicine**, v.57, Suppl.S41-4, p.41-44, 2013.

SIMMS, A. E. et al. Amplified respiratory-sympathetic coupling in the spontaneously hypertensive rat: does it contribute to hypertension?. **The Journal of physiology**, v.587, n.3, p.597-610, 2009.

SINSKI, M. et al. Atorvastatin reduces sympathetic activity and increases baroreceptor reflex sensitivity in patients with hypercholesterolaemia and systemic arterial hypertension. **Kardiologia Polska**, v.67, n.6, p.613-20, 2009.

SUN, B. et al. Maternal high-fat diet during gestation or suckling differentially affects offspring leptin sensitivity and obesity. **Diabetes**, v.61, n.11, p.2833-2841, 2012.

TRAILL, M. A. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol and very low density lipoprotein cholesterol by selective adsorption from serum with magnesium compounds. **Laboratory practice**, v.22, n.7, p.527-529, 1973.

TSUDUKI, T. et al. High dietary cholesterol intake during lactation promotes development of fatty liver in offspring of mice. **Molecular nutrition & food research**, v.60, n.5, p.1110-1117, 2016.

VIDAL-SANTOS, R. et al. Western diet in the perinatal period promotes dysautonomia in the offspring of adult rats. **Journal of developmental origins of health and disease**, v.8, n.2, p.216-225, 2017.

ZAMBRANO, E. et al. Maternal Obesity: Lifelong Metabolic Outcomes for Offspring from Poor Developmental Trajectories During the Perinatal Period. **Archives of medical research**, v.47, n.1, p.1-12, 2016.

ZOCCAL, D. B. et al. The nucleus of the solitary tract and the coordination of respiratory and sympathetic activities. **Frontiers in physiology**, v.5, n.238, p.1-12, 2014.

ZOCCAL, D. B. et al. Increased sympathetic outflow in juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia correlates with enhanced expiratory activity. **The Journal of physiology**, v.586, n.13, p.3253-3265, 2008.